

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 39/00		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/27954
			(43) Date de publication internationale: 10 juin 1999 (10.06.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02605		(FR) BOURGAULT-VILLADA, Isabelle [FR/FR]; 4, rue Joseph Granier, F-75007 Paris (FR).	
(22) Date de dépôt international: 2 décembre 1998 (02.12.98)		(74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harlé & Phélip, 7, rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).	
(30) Données relatives à la priorité: 97/15246 3 décembre 1997 (03.12.97) FR		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). INSTITUT PASTEUR DE LILLE [FR/FR]; 1, rue du Professeur Calmette, Boîte postale 245, F-59019 Lille Cedex (FR).		Publiée Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): VGRAS-MASSE, Hélène [FR/FR]; 321, rue de la Rosière, F-59710 Merignies (FR). BOSSUS, Marc [FR/FR]; 8, rue Deschodt, F-59000 Lille (FR). LIPPENS, Guy [BE/FR]; 48, rue de l'Amitié, F-59211 Santes (FR). WIERUSZESKI, Jean-Michel [FR/FR]; 16, rue des Fusillés, F-62221 Noyelles sous Lens (FR). TARTAR, André [FR/FR]; 1, rue du Moulin, F-62490 Vitry en Artois (FR). GUILLET, Jean-Gérard [FR/FR]; 39, rue Raphaël, F-92170 Vanves			
(54) Title: MIXED LIPOPEPTIDE MICELLES FOR INDUCING AN IMMUNE RESPONSE AND THEIR THERAPEUTIC USES			
(54) Titre: MICELLES MIXTES DE LIPOPEPTIDES POUR L'INDUCTION D'UNE REPONSE IMMUNITAIRE ET LEURS UTILISATIONS A DES FINS THERAPEUTIQUES			
(57) Abstract			
The invention concerns mixed micelles or micro-aggregates for inducing an immune response containing at least: a first lipopeptide comprising a CTL epitope and at least a first lipid motif; and a second lipopeptide comprising at least an auxiliary T epitope and at least a lipid motif, whereof the type can be different from the first lipopeptide motif. Said micelles can be used as medicines and vaccines.			
(57) Abrégé			
Micelles mixtes ou micro-agrégats pour l'induction d'une réponse immunitaire contenant au moins: un premier lipopeptide comprenant au moins un épitope CTL et au moins un motif lipidique, et un second lipopeptide comprenant au moins un épitope T auxiliaire et au moins un motif lipidique, dont la nature peut être différente du motif du premier lipopeptide. Ces micelles peuvent être utilisées dans des médicaments et vaccins.			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun		démocratique de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

**Micelles mixtes de lipopeptides pour l'induction
d'une réponse immunitaire et leurs
utilisations à des fins thérapeutiques »**

La présente demande a pour objet des micelles mixtes de lipopeptides pour l'induction d'une réponse immunitaire.

Elle a en outre pour objet l'utilisation de ces micelles à des fins thérapeutiques.

Il existe deux types de réponse immunitaire effectrice: la réponse humorale due aux anticorps, et la réponse cytotoxique due aux lymphocytes T CD8⁺.

Une réponse cytotoxique efficace requiert la présentation des antigènes aux lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (CTL), en association avec les molécules de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC), mais aussi aux lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (HTL) en association avec les molécules de classe II du MHC.

L'utilisation de lipopeptides pour l'induction d'une réponse cytotoxique, c'est-à-dire la génération in vivo de lymphocytes T cytotoxiques a déjà été décrite. En particulier, la demande FR-90 15 870 publiée sous le n°2 670 787 (Institut Pasteur de Lille, Institut Pasteur, INSERM) décrit des lipopeptides constitués d'une partie peptidique comprenant de 10 à 40 acides aminés et d'une partie lipidique qui peut être dérivée d'acides gras ou de groupements stéroïdes.

Ces lipopeptides montrent une bonne aptitude à induire une réponse cytotoxique. Il convenait cependant de les rendre capables d'induire une réponse de meilleure qualité par l'adjonction d'une réponse T auxiliaire dont on sait l'importance pour l'induction efficace et le maintien de la réponse cytotoxique. Il convenait en outre de les rendre capable d'induire une réponse chez le plus grand nombre d'individus.

BOURGAULT et al. (1994, J. Immunol., 2530-2537) ont induit une réponse CTL et HTL à partir de mélange de lipopeptides, sous la forme d'une émulsion avec un adjuvant huileux.

Néanmoins, il était nécessaire d'ajouter de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA). L'immunogénicité de la préparation vaccinale utilisée impliquait nécessairement la co-présentation fonctionnelle des motifs HTL et CTL situés dans un ou plusieurs lipopeptides du mélange. Cependant, l'efficacité de la co-présentation des différents motifs impliqués dépendait de l'association avec l'adjuvant Incomplet de Freund
10 au sein d'une émulsion très fine.

Un article au nom de VITIELLO et al. (1995, J. Clin. Invest., 95, 341-349) évoque la possibilité d'induire une réponse CTL dans une population humaine sélectionnée (HLA-A2) en utilisant un lipopeptide comportant une association séquentielle entre un épitope CTL HLA-A2
15 et un épitope auxiliaire (HTL) multivalent. On notera que cette étude a été menée sur une population génétiquement restreinte.

Cet article rend compte également d'une expérience au cours de laquelle deux types d'associations entre épitope HTL et épitope CTL ont été comparées: d'une part une association covalente séquentielle au sein d'un même lipopeptide, et d'autre part une association par simple
20 mélange d'un lipopeptide comportant le motif CTL avec un peptide comportant le motif HTL. Les résultats de cette étude montrent un avantage très net de l'association covalente par rapport au mélange, tel qu'il a été réalisé par ces auteurs, c'est-à-dire par mélange de solutions
25 comportant du DMSO et du tampon PBS (les peptides ou lipopeptides sont maintenus en solutions stock à une concentration de 10 - 20 mg/ml et dilués extemporanément avec du PBS avant usage).

Cependant, la combinaison sur une même molécule lipopeptidique des épitopes cytotoxique et auxiliaire, bien que pouvant

induire une réponse immunitaire efficace, nécessite la synthèse de séquences d'acides aminés longues présentant de multiples épitopes susceptibles de s'associer à plusieurs HLA ou superfamilles d'HLA de classe I et de classe II. L'association covalente de tous ces motifs au sein d'une unique molécule représente des difficultés techniques 5 difficilement surmontables, tant du point de vue des méthodes de synthèse que des méthodes de caractérisation analytique.

En tout état de cause, cet article mentionne l'association d'un lipopeptide et d'un peptide, et non de deux lipopeptides. De ce fait 10 aucune formation de micelles mixtes ne peut avoir lieu.

Un autre article, publié par **DON DIAMOND et al** (1997, Blood, 90, n°5), mentionne l'immunogénicité d'un mélange entre un peptide portant un épitope CTL minimal (pp65, séquence 495-503 de la protéine de matrice du cytomégalovirus) et un peptide dipalmitoyle contenant un 15 épitope HTL. Le mélange est réalisé par mélange des solutions dans l'acide acétique dilué ou dans le DMSO, en utilisant un traitement par les ultrasons pendant 15 à 30 secondes.

Cet article ne décrit donc pas de mélange de lipopeptides contenant indépendamment un épitope CTL et un épitope HTL, mais le 20 mélange d'un lipopeptide contenant un épitope HTL et d'un nonapeptide correspondant à un épitope CTL minimal. D'ailleurs il n'est pas mentionné de formation de micelles mixtes ou de micro-agrégats. Dans ce cas particulier cependant, la possibilité d'association directe du nonapeptide avec les CMH de classe I exprimés à la surface des cellules 25 peut expliquer le succès de l'approche suivie. L'immunogénicité de la préparation signifie qu'il y a eu effectivement co-présentation des épitopes HTL et CTL par la même cellule présentatrice de l'antigène; cependant, le nonapeptide minimal utilisé présente la capacité à se lier directement avec les CMH de classe I à la surface de la cellule

présentatrice de l'antigène, sans que soit nécessaire son apprêtement par la cellule.

Les auteurs concluent en reconnaissant que plusieurs obstacles existent encore pour obtenir une immunité à long terme, ce qui
5 confirme le caractère expérimental de cette étude.

La difficile obtention d'une réponse immune dépendant d'un double apprêtement de peptides présentant séparément les épitopes HTL et CTL, est maintenant expliquée par une publication de STUHLER (1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 622-627). Pour pouvoir observer
10 l'induction d'une réponse CTL, il est absolument nécessaire que les épitopes HTL et CTL soient présentés à la surface de la même cellule présentatrice de l'antigène (CPA) pour pouvoir être reconnu à la fois par les cellules T auxiliaire reconnaissant l'épitope HTL et les cellules T cytotoxiques reconnaissant l'épitope CTL.

15 Il ressort donc de ce qui précède que des compositions contenant au sein de mêmes micelles, ou de mêmes micro-agrégats, d'une part des lipopeptides présentant un épitope CTL et d'autre part des lipopeptides comprenant un épitope T auxiliaire, c'est-à-dire des micelles ou micro-agrégats mixtes, n'ont à la connaissance du
20 demandeur, jamais été décrites.

Or, comme indiqué ci-dessus, il est absolument nécessaire que les deux épitopes, cytotoxique et T auxiliaire, soient présentés à la surface de la même cellule présentatrice de l'antigène.

Outre la nécessité d'une co-présentation des deux épitopes à la
25 surface de la même cellule, il est aussi indispensable de solubiliser les lipopeptides, afin de permettre leur administration aux patients, et leur stérilisation par filtration.

Le demandeur s'est donc attaché à trouver une solution à ces divers problèmes.

Il a montré que pour obtenir des micelles formées individuellement de tous les peptides présents dans le mélange, qu'ils contiennent des épitopes HTL ou CTL, il était nécessaire d'associer les différents lipopeptides après les avoir au préalable dispersés au stade
5 moléculaire dans un solvant adapté.

La présente invention a donc pour objet des micelles ou micro-agrégats pour l'induction d'une réponse immunitaire contenant au moins:

- un premier lipopeptide comprenant au moins un épitope CTL, ou épitope cytotoxique, et au moins un motif lipidique, et
- 10 - un second lipopeptide comprenant au moins un épitope auxiliaire et au moins un motif lipidique, dont la nature peut être différente du motif du premier lipopeptide.

Au sens de la présente invention, l'expression « réponse immunitaire » désigne la totalité de la réponse immunitaire induite, qui
15 comprend la réponse cytotoxique et la réponse humorale.

Les micelles selon la présente invention ne sont pas limitées à deux lipopeptides, mais peuvent comprendre d'autres lipopeptides présentant indépendamment des épitopes HTL ou CTL.

On entend, pour la compréhension de la présente invention, par
20 épitope T auxiliaire, une séquence d'acides aminés capable de s'associer à au moins un récepteur HLA de classe II, et capable d'être reconnue par les lymphocytes T auxiliaires.

On entend par épitope CTL une séquence d'acides aminés capable de s'associer à au moins un récepteur HLA de classe I et
25 capable d'être reconnue par les lymphocytes T cytotoxiques.

Les épitopes T auxiliaires capables de s'associer à plusieurs récepteurs HLA de classe II différents sont appelés épitopes auxiliaires multivalents (HTL multivalents).

En outre, on entend par micelles ou par micro-agrégats des
30 agrégats de lipopeptides présentant une taille les rendant assimilables

simultanément par toute cellule présentatrice de l'antigène (CPA) et préférentiellement d'une taille inférieure à environ 1µm.

Les micelles mixtes selon la présente invention, c'est-à-dire comprenant des lipopeptides comportant des épitopes cytotoxiques et des lipopeptides comportant des épitopes T auxiliaires, présentent l'avantage d'associer au sein du même microvolume assimilable par une seule CPA une grande diversité d'épitopes CTL et HTL, sans que soit nécessaire leur association covalente, tout en respectant le critère de définition chimique requis. Des micelles constituées chacune d'une seule variété de lipopeptide, contenant un épitope CTL ou un épitope HTL ne permettent pas d'obtenir une coprésentation efficace correspondant à l'induction d'une réponse effectrice forte.

En outre, l'obtention d'une réponse CTL grâce à l'emploi de micro-agrégats ou de micelles mixtes permet d'éviter l'utilisation d'émulsions avec des adjuvants huileux, tels que l'adjuvant incomplet de Freund, dont l'emploi n'est pas admis en thérapeutique humaine. Les micelles et micro-agrégats selon la présente invention sont cependant compatibles avec l'emploi d'émulsions avec des excipients huileux cliniquement acceptables.

Un autre avantage des micro-agrégats ou micelles mixtes selon la présente invention, comprenant individuellement au moins deux types de lipopeptides, réside dans le fait que la solubilisation de lipopeptides présentant une faible solubilité dans l'eau ou dans des solvants cliniquement acceptables, ou de lipopeptides insolubles, peut être facilitée par leur combinaison avec d'autre(s) lipopeptide(s) présentant une meilleure solubilité.

Les micelles selon la présente invention présentent encore l'avantage, par rapport aux lipopeptides dans lesquels les motifs HTL et CTL sont associés de manière covalente et dont la taille est limitée, tels

que décrits par VITIELLO et al. (1995, précédemment cité), de permettre l'association d'une grande diversité de motifs et donc de pouvoir être utilisés pour la vaccination de populations humaines ou animales non sélectionnées sur la base de la restriction génétique.

5 Les micelles selon la présente invention peuvent comprendre un lipopeptide présentant au moins un épitope CTL et un autre lipopeptide comprenant au moins un épitope auxiliaire. Néanmoins, de telles micelles peuvent aussi contenir plusieurs lipopeptides différents comprenant différents épitopes cytotoxiques et différents lipopeptides
10 présentant différents épitopes auxiliaires.

Les motifs lipidiques des lipopeptides peuvent être indépendamment un ou plusieurs motifs en C₄ à C₁₈, et en particulier une ou plusieurs chaînes dérivées d'acides gras, ou d'alcools gras, en C₄ à C₁₈, éventuellement ramifiés et insaturés ou être dérivés d'un
15 stéroïde.

Ils peuvent comprendre une ou deux chaînes lipidiques en C₄ à C₁₈ associées par liaison covalente à un ou deux acides aminés de la partie peptidique. Ils peuvent ainsi être constitués de deux chaînes d'acide palmitique liées aux groupements NH₂, alpha et epsilon, d'une
20 lysine.

Ces motifs lipidiques peuvent aussi être constitués de, ou comprendre un résidu d'acide palmitique, d'acide 2-amino-hexadécanoïque d'acide oléique, d'acide linoléique, d'acide linolénique, de pimélaute, de trimélaute, ou un dérivé du cholestérol, ou tout
25 autre constituant lipidique naturel des membranes cellulaires.

De manière avantageuse, les lipopeptides constituant les micelles ou les micro-agrégats mixtes sont hydrosolubles dans une proportion d'au moins 30% (en poids). Ces lipopeptides hydrosolubles ont des propriétés de tensioactifs cationiques, propres à exercer un effet
30 solubilisant vis-à-vis d'autres lipopeptides en milieu acide faible.

La partie non lipidique comprend quant à elle entre 10 et 100, et préférentiellement entre 10 et 50 acides aminés. Le nombre d'acides aminés dépend du nombre d'épitopes constituant la partie non lipidique du lipopeptide et de leurs tailles, de la nature de la partie lipidique, et des proportions des parties lipidiques et non lipidiques.

De manière avantageuse, les épitopes HTL et CTL employés sont des épitopes capables de s'associer à plusieurs HLA différents, ou épitopes multivalents (« promiscuous épitopes » en anglais).

L'épitope HTL employé est préférentiellement constitué par le peptide multivalent 830-843 de la toxine tétanique.

QYIKANSKFIGITE

La glutamine (Q) de cette séquence peut éventuellement être acétylée.

D'autres épitopes HTL multivalents peuvent être l'épitope multivalent de l'hémagglutinine (PREVOST-BLONDEL et al. 1995, J. Virol., vol.62, n°12, pages 8046-8055) ou encore l'épitope PADRE (ALEXANDER et al., 1994, Immunity, 1, 751).

L'épitope CTL peut quant à lui être tout épitope capable d'activer des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺.

Il est préférentiellement un épitope CTL d'une protéine présentée par une cellule tumorale et en particulier par un mélanome, d'une protéine du VIH, du virus de l'hépatite B (VHB) ou du papillomavirus, ou encore de la protéine p53.

Il peut être en particulier l'un des épitopes suivants:

- épitopes de la protéine BCR-ABL, résultant de la translocation BCR- Abelson (leucémie myéloïde chronique) tels que mentionnés dans le tableau 1.
- épitopes de la protéine p53, tels que ceux mentionnés dans le tableau 2.

Les épitopes de la protéine p53 peuvent en outre être pris dans les séquences 25-35, 63-73, 129-156, 149-156, 187-205, 187-234, 226-264, ou 249-264 de cette protéine.

- épitopes des protéines E₆ ou E₇ du papillomavirus humain (VPH), tels que ceux mentionnés dans le tableau 3.

-épitopes de protéines du virus VIH-1 tels que ceux mentionnés dans le tableau 4,

5 - épitopes du mélanome ou d'autres tumeurs, tels que ceux mentionnés dans les tableaux 5, 6 et 7 et en particulier épitopes de l'antigène melan-A/mart-1 du mélanome.

10 D'autres épitopes CTL plurivalents présentant une capacité d'association avec des HLA de classe I peuvent être ceux compris dans le peptide 43-57 de HPV (GQAEPDRAHNIVTF) qui contient des épitopes HLA A2, A24, B7 et B18.

Les épitopes CTL peuvent encore être ceux d'antigènes parasitaires, et en particulier de *Plasmodium falciparum*.

15 Les micro-agrégats ou micelles mixtes de lipopeptides selon la présente invention peuvent être lyophilisés, puis repris par tout tampon cliniquement acceptable pour être administrés aux patients à traiter, en particulier aux personnes à vacciner.

20 Ils peuvent être administrés par toute voie d'administration employée en thérapeutique et à titre non limitatif, par voie parentérale, percutanée, orale, sublinguale ou par nébulisat intra-pulmonaire.

25 Un autre objet de la présente invention est donc l'utilisation de ces lipopeptides pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin pour l'induction d'une réponse immunitaire spécifique, et en particulier, pour l'induction d'une réponse immunitaire à l'encontre de cancers tels que le mélanome, des virus VIH et VHB, des papillomavirus, de la p53 ou de la malaria.

30 La présente demande a encore pour objet une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient une quantité pharmacologiquement active d'un ou plusieurs des lipopeptides décrits ci-dessus, ainsi que des excipients pharmaceutiquement compatibles.

La présente demande est en outre relative à une méthode d'induction d'une réponse immunitaire à l'encontre d'un antigène comprenant l'administration de micelles ou de micro-agrégats, tels que décrits ci-dessus à un individu pour lequel une telle réponse est
5 recherchée.

Elle a en outre pour objet une méthode d'immunisation à l'encontre d'un agent pathogène comprenant l'administration à un individu pour lequel une telle immunisation est recherchée de micelles ou de micro-agrégats tels que décrits ci-dessus. De tels agents
10 pathogènes, et antigènes peuvent être ceux indiqués ci-dessus.

Les lipopeptides formant les micelles selon la présente invention peuvent être fabriqués par tout procédé adéquat connu de l'homme du métier. Ils peuvent en particulier être obtenus par les méthodes Boc-benzyle ou Fmoc-tertiobutyle, en particulier comme
15 décrits dans la demande FR-90 15 870, dont le contenu est intégré par référence à la présente demande .

L'introduction de la chaîne lipidique peut être réalisée en phase solide, après déprotection sélective de la ou les fonction(s) concernées, comme décrit dans l'article de **DEPREZ et al.** (1996 , Vaccine, volume
20 14, n°5,375-382). La chaîne lipidique peut être introduite sur la fonction ϵ -NH₂ d'une lysine protégée sur la fonction α -NH₂ par un groupe F-moc. La Fmoc-lys (Palm) obtenue peut être ensuite utilisée en synthèse en phase solide pour élaborer le lipopeptide.

Les micelles et micro-agrégats selon la présente invention
25 peuvent être obtenus en dispersant chaque lipopeptide dans une solution d'acide acétique concentrée à environ 80% puis en mélangeant les solutions ainsi obtenues.

La qualité de la dissolution, c'est à dire la dispersion effective à l'état moléculaire de chaque lipopeptide avant la préparation du mélange est vérifiée par la méthode de résonance magnétique nucléaire en deux dimensions (RMN2D). La résolution du signal obtenu lors d'expériences en deux dimensions homonucléaires dans un champ de 600 Mhz confirme la dispersion complète, au stade moléculaire, des lipopeptides en solution. La limpidité du mélange n'est pas un critère suffisant : en particulier, la reprise des lipopeptides par du DMSO ou un mélange DMSO/eau ne permet pas, dans la plupart des cas, d'obtenir cet état de dispersion, ce qui explique l'inefficacité du mélange étudié par VITIELLO et al. (1995, précédemment cité). La dissolution par des mélanges acide acétique/eau plus dilués en acide acétique ne permet pas non plus de préparer dans tous les cas un mélange de micro-agrégats ou micelles mixtes comportant une proportion statistique de chaque constituant du mélange au stade du microvolume. Dans ces deux cas, même en présence d'un mélange apparemment limpide, la filtration stérilisante sur membrane de 0,22 μm est soit impossible, soit irrégulière, avec des rendements de filtration différents selon les constituants, ce qui signifie qu'à l'échelle d'une particule de cette taille, la représentation de chacun des constituants du mélange n'est pas obtenue. Cette microhétérogénéité compromet l'immunogénicité du mélange, puisqu'elle compromet la capture et la présentation simultanée de tous les constituants par une seule cellule présentatrice d'antigène (CPA), dans le cas d'épitopes CTL et HTL présents sur des lipopeptides distincts.

La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples qui suivent.

La figure 1 représente la structure chimique de la résine de type KNORR-MBHA.

Les figures 2 et 3 représentent des spectres de résonance magnétique nucléaire en deux dimensions (RMN 2D), respectivement d'un lipopeptide seul (lipopeptide ENV), et d'un mélange de lipopeptides.

La figure 4 illustre la réponse auxiliaire de huit macaques immunisés avec un mélange de lipopeptides.

Les figures 5A à 5F illustrent la réponse cytotoxique du macaque n°109.

Les figures 6A à 6D illustrent la réponse cytotoxique du macaque n°129.

Les figures 7A et 7B illustrent la réponse cytotoxique du macaque n°127.

Les figures 8, 9, 10 et 11 illustrent respectivement les réponses cytotoxiques des macaques N^{OS} 102, 105, 120 et 125.

Les figures 12A, 12B et 12C représentent respectivement les activités cytolytiques anti-N1, anti-G2 et anti-E des PBMC, de cellules CD8⁺ et de cellules CD4⁺ de l'individu V4.1.

La figure 13 quant à elle illustre l'activité cytolytique de PBMC de l'individu V4.5 collectées vingt semaines après le début de l'immunisation, stimulées in vitro avec le peptide N2 puis testées pour leur activité CTL à l'encontre de la vaccine sauvage (WT), ou de ce même virus exprimant une protéine NEF recombinante (NEF, NEF-2, NEF-MN, NEF-A, NEF-ROD).

EXEMPLE 1 : Préparation de micelles ou micro-agrégats selon l'invention:

1 - description des lipopeptides employés dans le mélange

	nom	formules:	poids moléculaire
5	NEF 66	VGFVPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLK(Pam)-NH ₂	3862,77
	NEF 117	TQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGW CYKLVP K(Pam)-NH ₂	4017,754
10	NEF 182	EWRFDSRLAFHHVARELHPEYFKN K(Pam)-NH ₂	3451,04
	GAG 183	DLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDR K(Pam)-NH ₂	3983,65
	GAG 253	NPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILD K(Pam)-NH ₂	4063,05
15	ENV TRPNNNTRKSIHIGPGRAFYATGEIIGDIRQAH K(Pam)-NH ₂		4027,69

épitopes CTL représentés

20	RPNNNTRKSI	HLA-B27	TQGYFPDWQNY	HLA-B62
	PPIPVGEIY	HLA-B35	YFPDWQNYT	HLA-B17, B35
	KRWIILGLNK	HLA-B27	TPGPGVRYPL	HLA-B7
	LGLNKIVRM	HLA-B62	RYPLTFGW	HLA-B27.2
	QVPLRPMTYK	HLA-A3, A11, B27.2	YPLTFGWC	HLA-B18
25	VPLRPMTY	HLA-B35	AFHHVAREL	HLA-B52
	AVDLSHFL	HLA-B62	FLKEKGGL	HLA-B8
	AVDLSHFLK	HLA-A11		

L'ensemble des épitopes représentés permettait d'espérer l'induction de réponses CTL chez une importante proportion de la population humaine, à condition de pouvoir bénéficier de l'effet auxiliaire des épitopes HTL non-définis, mais très probablement présents pour de simples raisons statistiques dans l'un quelconque des lipopeptides à

condition toutefois de réunir tous les épitopes, et donc, tous les peptides constituant du mélange dans chaque micro-unité de volume.

2- Synthèse

L'approche phase solide a été choisie, en utilisant la stratégie
5 Fmoc pour la protection de la fonction α-amine, et *t* Bu pour la protection des chaînes latérales. Le protocole utilisé est un protocole standard basé sur les méthodes de synthèse décrites par **ATHERTON** (Solid-Phase synthesis, a practical approach. IRL press, 1989) et **FIELDS** et **NOBLE** (*Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1990, 35, 161-214).

10 La Fmoc-Lys(Palm)-OH est couplée sur une résine de type KNORR-MBHA (figure 1). Après déprotection de la fonction α-amine, on couple le premier acide aminé (Fmoc-Leu-OH dans le cas de NEF 66 par exemple). L'agent de couplage a été le TBTU (3 eq) en présence de DIPEA (4.5 eq), en vérifiant les couplages par un test colorimétrique.
15 Une acétylation systématique a été réalisée après qu'une réaction négative ait été obtenue à ce test, pour minimiser au maximum le risque d'obtenir des peptides à délétion. On répète cette succession d'opérations jusqu'à ce que tous les acides aminés constitutifs de la séquence aient été introduits.

20 Après la synthèse, et déprotection du groupe Fmoc terminal, les peptides sont déprotégés et clivés par un mélange TFA/eau/DTT (NEF 66, ENV), TFA/eau/DTT/Ac-Trp-OH (GAG 183, GAG 253, NEF 117) ou TFA/eau/EDT/Ac-Trp-OH (NEF 182).

25 Les peptides sont purifiés chacun sur une colonne Vydac C18 qui a été exclusivement utilisée à cet effet, à température ambiante, avec un système solvant eau-acétonitrile, en tampon perchlorate ou TFA.

Ils sont ensuite mis sous forme d'acétate par échange d'ions sur colonne Dowex SBR, puis lyophilisés dans de l'acide acétique à 40 %.

Chaque peptide provient d'un lot unique de synthèse et purification. Aucune opération de recyclage de fractions de purification n'est pratiquée.

3 - Etudes de la solubilité des lipopeptides:

3-1) Utilisation de l'eau pure:

Les peptides NEF66, NEF117, NEF182 et ENV ont pu être dissous dans l'eau pure, à des concentrations allant jusque 5 mg/ml. Le peptide NEF117 donne cependant une solution très légèrement opalescente. Les peptides GAG 182 et GAG 253 ne sont pas solubles dans ces conditions.

Le mélange des lipopeptides est cependant soluble dans l'eau pure, indiquant un rôle potentiellement solubilisant des lipopeptides hydrophiles vis-à-vis des peptides peu solubles.

3-2) Utilisation du DMSO :

La mise en solution de lipopeptides est fréquemment réalisée à l'aide de solutions aqueuses de DMSO (diméthylsulfoxyde) . Ce solvant organique très puissant est en effet compatible après dilution avec la plupart des essais biologiques réalisés sur cellules ou chez l'animal, voire chez l'homme. L'utilisation de DMSO s'est avérée efficace pour une bonne reprise des peptides GAG 182 et GAG 253; les solutions obtenues ont ensuite pu être diluées par de l'eau pour atteindre une concentration finale de 1 mg/ml dans le DMSO à 20% dans l'eau; dans

ces conditions, la plupart des peptides donnent des solutions claires, sauf GAG 183, pour lequel on obtient une suspension.

Il est intéressant de souligner que même dans le cas de solutions claires, et malgré la compatibilité du DMSO avec les filtres Durapore, les solutions de lipopeptides dans le DMSO ne sont pas filtrables sur des filtres de porosité 0,22 μm , parce qu'elles imposent une pression incompatible avec la résistance mécanique des filtres. Cette observation indique la formation d'agrégats de taille supérieure à 0,22 μm . Dans certains cas, on a même observé une impossibilité de filtration sur des filtres résistant aux solvants, d'une porosité de 1 μm , en raison de la formation de gels (cette taille de filtre est en effet utilisée pour filtrer des solutions concentrées de lipopeptides avant purification par RP-HPLC).

3-3) Utilisation d'acide acétique concentré à 25%:

La mise en oeuvre de l'indispensable étape de filtration stérilisante nécessite donc l'emploi d'un solvant organique plus apte à dissocier les agrégats, compatible après dilution avec la lyophilisation, et non toxique à faible dose. L'acide acétique a été testé.

Dans un premier temps, une quantité minimale de ce solvant, a été mise en oeuvre qui est définie comme étant la quantité permettant l'obtention de solutions limpides à des concentrations de 5 mg/ml : pour les peptides GAG 183 et GAG 253, 25% d'acide acétique a été introduit; pour les autres peptides, une mise en solution dans l'eau pure a été réalisée.

Les solutions ont été soumises à une analyse par Résonance Magnétique Nucléaire dans un champ de 600 Mhz. Il a été constaté que, malgré l'apparente limpidité des solutions les lipopeptides de cette série,

même les lipopeptides les plus hydrophiles, forment des agrégats de taille importante qui interdisent ce type d'étude, en l'absence de signaux résolus.

La mise en solution dans ces conditions ne permet pas la
5 dispersion statistique, au stade moléculaire, de chacun des constituants, malgré l'apparente limpidité des solutions.

3-4) Utilisation d'acide acétique concentré à 80% :

L'utilisation d'acide acétique concentré à 80%, a alors été testée. Les peptides ont été mis en solution à une concentration de 1mM
10 dans 1 ml d'acide acétique à 80% (correspondant à : NEF 66 : 3,86 mg/ml; NEF 117 : 4,02 mg/ml; NEF182 : 3,45 mg/ml; GAG 183 : 3,98 mg/ml; GAG 253 : 4,063 mg/ml; ENV : 4,027 mg/ml).

Analyse des lipopeptides par RMN du proton à 600 Mhz

Les échantillons de lipopeptides ont été préparés en dissolvant
15 les lipopeptides dans une solution d'acide acétique (CD₃COOD, 99,5% atom D. EURISO-TOP. France)/H₂O; 80:20 (V:V). 4 µl d'une solution 50 mM de TMSP [3-(triméthylsilyl)-propane sulfonate de sodium] dans D₂O sont ajoutés pour référencer les déplacements chimiques. La concentration finale de chaque peptide est de 1mM dans au moins 2 ml
20 de solvant, qui sont transférés dans des tubes R.M.N. de 8 mm de diamètre (WILMAD 513A-7PP, Interchim, France).

Les spectres de R.M.N. du proton ont été réalisés sur un spectromètre RMN BRUKER DMX600 équipé d'une sonde BBI 8 mm avec gradient z, à une température de l'échantillon à 310°K.

Les expériences en deux dimensions homonucléaires NOESY (Nuclear-Overhauser effect spectroscopy) selon Kumar et al. (1980, Biochem. Biophys. Res; Comm., 95, 1-6) et TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) selon Bax et Davis (1985 J. Magn. Reson., 65, 355-360) et Griesinger et al. (1988 J.A.C.S., 110, 7870-7872) ont été obtenues avec 2048 x 512 points complexes et traitées après multiplication dans les deux dimensions par un sinus déplacé de $\pi/4$ avec 2048 x 1024 points, ceci pour une fenêtre spectrale de 12 ppm. Les temps de mélange étaient de 300 ms pour la NOESY et 160 ms pour la TOCSY. Durant le temps de mélange du TOCSY, un MLEV 16 était appliqué avec un champs B1 de 7,8 Khz. Afin d'être dans les mêmes conditions de température, le temps de « spin-lock » du TOCSY était appliqué hors résonance (+ ou - 1 Mhz) dans la NOESY. La suppression de l'eau est achevée en utilisant une légère présaturation de ce signal pendant le temps de relaxation et le temps de mélange de la NOESY.

L'analyse par RMN à haut champ des solutions a montré des signaux parfaitement résolus, permettant des expériences TOCSY-NOESY, et l'attribution séquentielle complète de chaque lipopeptide. Ce résultat signifie la dispersion complète, à l'échelon moléculaire, des lipopeptides dans l'acide acétique à 80%.

Le spectre RMN 2D du peptide ENV est représenté sur la figure 2 Les spectres de tous les peptides ont pu être obtenus dans les mêmes conditions et interprétés. Afin de vérifier si le mélange des solutions entre-elles n'altérerait pas la dispersion des lipopeptides, un spectre RMN 2D du mélange virtuel, a été obtenu par superposition sur une même représentation des 6 spectres obtenus individuellement. Il a été comparé avec le spectre RMN 2D effectivement obtenu par mélange des solutions (figure 3). La résolution des signaux est restée comparable, attestant

qu'aucun des peptides n'a altéré la solubilité des autres constituants du mélange.

L'analyse des séquences a nécessité une accumulation des signaux pendant 120 heures pour chaque lipopeptide, période au cours de laquelle aucune altération sensible des peptides n'a pu être détectée, ni par RMN, ni par RP-HPLC. Cette observation a donc permis d'envisager l'utilisation de ce solvant pour la solubilisation des lipopeptides, leur mélange, puis la filtration, même avec un temps de séjour de l'ordre de 1 ou 2 heures, éventuellement nécessaire à la manipulation de volumes relativement importants.

4 - Etudes de l'étape de filtration stérilisante:

4-1) Lipopeptides isolés:

Des essais de filtration stérilisante ont été réalisés à partir de solutions à 5 mg/ml de chaque lipopeptide dans l'eau pour les peptides NEF66, NEF117, NEF 182 et ENV et dans l'acide acétique à 25% pour les peptides GAG 183 et GAG 253. Les rendements de filtration de 1 ml sur filtres Millex GV SLGV 0130S (0,22 μ m) Millipore, suivie d'une lyophilisation figurent dans le tableau 8 (à la précision du dosage près).

Ces résultats sont en accord avec les études de solutions réalisées par RMN, et donnent des indications sur la taille des agrégats ou micelles détectés: certains peptides forment des agrégats de taille supérieure à 0,22 μ m, et conduisent par conséquent à des mélanges comportant des microhétérogénéités et une capture simultanée peu probable à l'échelle de la cellule présentatrice d'antigènes.

4-2) Préparation de divers mélanges de lipopeptides :

a) Préparation du lot CK2. Mélange simple des solutions. et obtention d'un mélange limpide, mais microhétérogène:

Pour la mise en solution des lipopeptides et la préparation du
5 mélange, des solutions d'aspect totalement limpide ont été mélangées
entre elles, afin d'évaluer l'éventuelle contribution du caractère
tensioactif des lipopeptides ENV, NEF 66, NEF117 et NEF182. Les
conditions sont résumées dans le tableau 9.

Les solutions obtenues ont été soumises à l'action d'ultrasons
10 pour faciliter la dispersion des agrégats, mélangées pour donner un
volume final de 5,5 ml. le mélange a été de nouveau soumis à l'action
d'ultrasons, puis dilué par 9,5 ml d'eau pour obtenir une concentration
finale d'environ 8 % en acide acétique (AcOH), compatible avec une
lyophilisation de bonne qualité. Cette solution, après un dernier séjour
15 dans le bain à ultrasons, a été filtrée sur filtres Millex GV SLGV 0130S
(0,22 μ m) Millipore. Les rendements de filtration des peptides en
mélange ont été calculés pour chaque lipopeptide, pour donner les
résultats représentés dans le tableau 9 en dernière colonne (à la
précision du dosage près).

20 L'hétérogénéité des rendements selon les peptides atteste de
l'hétérogénéité de la solution. Chaque peptide s'est comporté comme s'il
était filtré individuellement : ce comportement est particulièrement
évident avec le peptide GAG253, dont le rendement de filtration à partir
de cette solution à 8 % d'acide acétique est inférieur au rendement de
25 filtration observé lorsqu'il est filtré seul à partir d'une solution à 25%
d'acide acétique. Ce résultat confirme que, en dépit de l'apparente
limpidité du mélange en solution acétique diluée, le mélange entre les

lipopeptides n'a pas fourni de micro-agrégats ou micelles mixtes, incorporant notamment les peptides les plus hydrophobes. Les échanges de lipopeptides entre micelles se font mal dans ces conditions, et la fonction tensioactive des lipopeptides ENV, NEF66 , NEF 117 et
5 NEF182 ne peut se manifester.

b) Préparation du lot CK3 : préparation de micelles ou de micro-agrégats mixtes ne comportant pas de microhétérogénéité

Pour garantir le mélange réel au niveau de chaque micro-unité de volume des différents lipopeptides, une stratégie différente a été
10 suivie :

- chaque lipopeptide a été mis en solution dans l'acide acétique à 80% afin d'exploiter les propriétés dissociantes de ce solvant.
- afin d'exploiter les propriétés de tensioactif cationique attendues des peptides ENV, NEF66 , NEF 117 et NEF182 en milieu
15 acide faible lors de l'étape de dilution, les lipopeptides ont été dispersés en solution d'acide acétique à 80% selon la répartition suivante : 1 : ENV, 2 : NEF66 , 3 : NEF 117 , 4 : NEF182, en terminant par la dispersion des deux lipopeptides les plus hydrophobes dans une solution désormais concentrée en agents dissociants : acide acétique et
20 détergents cationiques . Le cinquième lipopeptide introduit a été GAG 183 et le sixième : GAG 253. Les ultrasons sont utilisés à chaque étape pour assurer une dispersion efficace des agrégats.

Les solutions sont mélangées, puis filtrées sur filtres Millex GV SLGV 0130S (0,22 µm). La filtration nécessite une pression plus faible
25 que lors de la filtration de la solution à 8%. Les récipients utilisés et le filtre sont ensuite rincés avec de l'eau, en quantité suffisante pour obtenir une concentration finale en acide acétique de 8 % (volume final 15 ml comme précédemment), afin d'assurer la qualité de l'étape de

lyophilisation. Les rendements de filtration des peptides en mélange ont été calculés pour chaque lipopeptide, pour donner les résultats donnés dans le tableau 10 en dernière colonne (à la précision du dosage près).

L'homogénéité des rendements confirme l'homogénéité de la solution résultant de la dispersion à l'échelon moléculaire au moment de la filtration dans l'acide acétique concentré. La dilution ultérieure ne peut participer à un regroupement de chaque peptide en entités monovalentes, en application des lois de l'entropie. Cette méthode de préparation du mélange a donc permis l'obtention de micelles mixtes, comportant nécessairement chacune une représentation statistique de chaque lipopeptide. Les propriétés tensioactives des lipopeptides peuvent s'exercer et garantir la solubilité dans l'eau des doses de vaccins après lyophilisation ainsi que la stabilité des solutions pendant le temps des manipulations.

15 c) Préparation du Lot CK9

La procédure utilisée est la même que pour le lot précédent, aux quantités près. La solution de peptide (20 mg/ml dans l'acide acétique à 80 %) a été filtrée en 4 fois, avec changement de filtre avant leur saturation, en utilisant des membranes identiques (unités stériles STERIVEX GV 0,22 µm Durapore (Millipore), puis complétée avec de l'eau utilisée pour rincer les filtres et diluer. Le volume final atteint était de 1516 ml (dont 154 ml d'acide acétique : solution finale a 10%). Le volume de répartition était de 1,3 ml par dose. Les doses réparties ont été lyophilisées, et dosées en utilisant une méthode de dosage validée par HPLC. Le rendement de filtration pour chaque lipopeptide est indiqué ci-dessous dans le tableau 11, et prend en compte la sensibilité du dosage de chaque lipopeptide.

Lors de la préparation de ce lot, on observe encore une bonne homogénéité des rendements de filtration confirmant la formation de micelles ou micro-agrégats mixtes, chaque micro-unité comprenant une proportion équivalente de chaque constituant du mélange.

- 5 Le mélange après dilution et lyophilisation fournit une poudre blanche formant un gâteau compact et homogène, très facilement remis en solution par de l'eau pure, ou un solvant capable de restaurer l'osmolarité de la solution (glucose à 5%, mannitol à 5%). La solution présente une très légère opalescence. Le pH obtenu lors de la reprise
10 par un solvant non tamponné est de 4,90. L'élévation du pH de 1 point provoque la formation lente d'un précipité: ce comportement contribue à la formation d'un dépôt lors de l'injection sous-cutanée ou intramusculaire.

d) Essai d'uniformité de teneur sur le lot CK9

- 15 Selon la Pharmacopée, les poudres pour usage parentéral sont soumises à l'obligation d'uniformité de teneur. L'essai doit être réalisé sur 10 unités prises au hasard, pour lesquelles on réalise individuellement un dosage du principe actif au moyen d'une méthode analytique appropriée. La préparation satisfait à l'essai si la teneur de
20 chaque unité est comprise entre 85 et 115 % de la teneur moyenne.

- L'essai a été réalisé sur 15 échantillons pris au hasard, remis en solution et dilués dans de l'acide acétique à 80 % selon une procédure opératoire standardisée, de façon à injecter une proportion toujours identique d'environ 15 µg, définie lors de l'obtention de la droite
25 étalon. Chaque échantillon a été injecté trois fois, le dosage de chaque principe actif correspondant à la moyenne des trois valeurs obtenues.

Les valeurs obtenues figurent dans le tableau 12 ci-après. La répartition des valeurs est clairement statistique. On observe toutes les valeurs à l'intérieur d'un espace défini pour un test bilatéral avec un $P = 0,975$ (sauf trois valeurs aberrantes, toutes retrouvées dans le flacon n°1, pouvant correspondre à une erreur de dilution). Les valeurs minimales et maximales définies se situent à l'intérieur des limites imposées par la Pharmacopée (l'écart observé se situe entre 4 et 14,95% selon les peptides, variation liée à l'imprécision inhérente au dosage).

L'absence de microhétérogénéité de la solution est confirmée par le fait que les doses de vaccins réparties ont satisfait à l'essai d'uniformité de teneur.

EXEMPLE 2- Préparation d'un mélange de lipopeptides (SIV-Mortara 1) et essai d'immunogénicité chez le macaque.

1) Préparation du lot SIV-Mortara 1

Ce lot de petite taille a été préparé pour réaliser une étude pré-clinique chez le macaque, pour vérifier la tolérance et l'immunogénicité. Ce lot résulte du mélange des lipopeptides suivants:

nom formules:

NEF 101	SVRPKVPLRAMTYKLAIMSHFIKEK K(Pam)-NH ₂
NEF 125	EKGGLGIIYYSARRHRILDMYLE K(Pam)-NH ₂
NEF 155	DWQDYTSGPGIRYPKTFGWLWKLK K(Pam)-NH ₂
NEF 201	SKWDDPWGEVLAWKFDPTLAYTYEA K(Pam)-NH ₂
NEF 221	YTYEAYARYPEELEASQACQRKRLEEG K(Pam)-NH ₂
GAG165	KFGAEVVPGFQALSEGCTPYDINQMLNCVGDK(Pam)-NH ₂

GAG246QIQWMYRQQNPVGNIRRWIQLGLQKCVRMYNPTN
K(Pam)-NH₂

TT Ac- QYIKANSKFIGITELKK K(Pam)-NH₂

5 Leur mélange a été réalisé à partir des solutions dans l'acide acétique concentré, comme lors de la préparation du lot CK3.

2) Immunogénicité chez le macaque.

a) Matériels et méthodes

10 Les macaques, numérotés respectivement 102, 105, 109, 117, 120, 125, 127 et 129 ont été immunisés par injection sous-cutanée du lot préparé ci-dessus (500 µg), dans de l'eau stérile et ont été réinjectés dans un délai de trente jours et de soixante jours.

Ces immunisations ont été effectuées en accord avec les
15 directives de l'Union Européenne.

Obtention de lignées CTL

Des cellules sanguines (PBMC) ont été isolées par centrifugation dans un gradient de densité à travers un milieu de séparation de lymphocytes (Pharmacia, Uppsala, Suède). Elles ont été
20 utilisées immédiatement, ou stockées à -180°C dans de l'azote liquide. Des lignées CTL anti-peptide ont été obtenues en cultivant les PBMC des singes (2×10^6 cellules/ml) dans des plaques de microtitration, dans du RPMI 1640 complété avec de la pénicilline (100U/ml), de la streptomycine (100 µg/ml) de la L-glutamine (2 mM), des acides aminés
25 non essentiels (1%), du pyruvate de sodium (1 mM), du tampon HEPES (10 mM), du 2-mercaptoéthanol (2×10^{-5} M) et du sérum de veau foetal inactivé par la chaleur (FCS) à 10%.

Le mélange des sept peptides libres, c'est-à-dire sans motif lipidique. (5 μ m de chaque) correspondant aux séquences lipopeptidiques a été ajouté dans chaque puits.

Les plaques ont alors été incubées durant trois jours à 37°C et
5 de l'Interleukine-2 a été ajouté dans chaque plaque (10 IU/ml).

Après sept jours et quatorze jours, les cellules effectrices ont été stimulées en ajoutant de nouveaux PBMC autologues, qui ont été mis en contact durant deux heures avec le mélange de peptide (5 μ m de chaque), puis lavés et irradiés (4000 rads).

10 Mise en évidence de la prolifération des cellules T

Des cellules PBMC (2×10^5 dans 200 μ l par puits) ont été cultivées dans des plaques contenant 1 μ g/ml du lipopeptide TT (830-846), et 10 μ g/ml du peptide issu de la toxine tétanique (TT).

Après cinq jours de culture, 1 μ Ci de [3 H]TdR a été ajouté
15 dans chaque puits et l'incubation a été poursuivie durant dix huit heures. Les cellules ont été alors récoltées à l'aide d'un récolteur automatique de cellules puis l'incorporation de la thymidine tritiée a été quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation.

Analyse phénotypique des lignées cellulaires CTL

20 Le phénotype des lignées cellulaires a été déterminé le jour où le test de largage du chrome a été effectué, en incubant les cellules avec des anti-CD4 conjugués à du FITC (OKT4, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ) et avec un anti-CD8 conjugué à de la phycoérythrine (Leu-2a, Becton Dickinson, Mountain View, CA) durant
25 trente minutes à 4°C. Les cellules ont été lavées avec du tampon PBS puis le pourcentage de cellules colorées a été déterminé à l'aide d'un

cytomètre de flux Epics Elite (Coulter, Margency, France). Des anticorps présentant un mélange d'isotypes ont été utilisés comme témoins.

Transformation in vitro des lignées cellulaires B (B-LCL)

5 Les lignées cellulaires B (B-LCL) ont été obtenues en incubant des dilutions en séries de PBMC à l'aide du surnageant de la lignée cellulaire S 594. Cette lignée est infectée par le virus de l'herpès du babouin qui immortalise les cellules (herpès virus papio). Les B-LCL ont été ensuite cultivées dans du milieu de culture complémenté avec
10 10% de FCS.

Test de relarguage du chrome.

Des cellules cibles ont été sensibilisées avec les peptides. 10^6 cellules B-LCL ont été incubées soit durant la nuit soit durant 1 heure, respectivement avec des peptides longs ou courts (gamme de
15 concentration 10^{-5} M- 10^8 M) à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂. Afin d'obtenir les cellules cibles présentant les produits du gène SIVmac, les B-LCL ont été incubés à une concentration de 10^6 cellules/ml avec un virus de la vaccine recombinante (20 PFU/cellule)
20 durant dix huit heures dans les mêmes conditions. Les BLCL ont été ensuite lavées et marquées avec 100µm Ci Na₂⁵¹CrO₄ (NEN Life Science Products, Courtaboeuf Les Ullis, France) durant 1 heure, lavées deux fois et utilisées comme cellules cibles. Le relarguage du ⁵¹Cr a été effectué dans des plaques de microtitration. L'activité cytolytique des
25 lignées cellules anti-SIV a été mesurée en mélangeant 5×10^3 cellules cibles marquées au chrome avec des cellules effectrices, dans des rapports cellules effectrices/cellules cibles divers, dans un volume final de 200 µl/puits. Les plaques ont été incubées durant 4 heures à 37°C,

puis 100 µl de surnageant ont été pris dans chaque puits et analysés dans un compteur de rayonnement gamma.

Le relarguage spontané du chrome a été déterminé en incubant les cellules cibles avec du milieu seul. Il n'excède jamais 20%
5 du chrome total incorporé.

Le relarguage spécifique du chrome a été mesuré de la manière suivante:

$$100 \times (\text{cpm expérimentaux} - \text{cpm spontané}) / (\text{cpm maximum} - \text{cpm spontané}).$$

10 La variation à l'intérieur d'un échantillon n'excède jamais plus de 5%.

b) Résultats

La figure 4 illustre la réponse T auxiliaire des huit macaques.

15 Les figures 5 a 11 illustrent la réponse cytotoxique des macaques.

Les résultats des immunisations avec divers peptides sont résumés dans le tableau 13.

Ils montrent que sept des huit macaques testés reconnaissent
20 divers peptides, les macaques n°109, 129 et 127 montrant une réponse particulièrement importante.

L'efficacité de l'induction d'une réponse CTL confirme que les CPA des animaux ont pu capturer et présenter un ou plusieurs épitopes CTL, et simultanément l'épitope auxiliaire fort présent dans l'anatoxine
25 tétanique et reconnu par certains des animaux.

EXEMPLE 3:**Préparation d'un mélange de lipopeptides (Lot HG 1) en vue d'un essai clinique chez l'homme .**

Un mélange de lipopeptides a été défini en vue de la réalisation
 5 d'un essai clinique (VAC10), associant au sein de micelles le même peptide TT à des séquences choisies sur le principe de sélection développé pour VAC04 (existence d'un ou plusieurs épitopes CTL par séquence).

- la cystéine du peptide NEF117 a été remplacée par une
 10 Leucine : après synthèse et essai sur test cellulaire de plusieurs analogues du nonapeptide épitope CTL renfermant cet acide aminé, il a en effet été observé que ce remplacement était possible; cette modification permet d'éviter les problèmes de stabilité dus à la formation de pont disulfure.

15 - le peptide GAG 17 a été choisi parmi d'autres candidats pour son caractère nettement tensioactif cationique susceptible d'aider au maintien en solution des autres peptides, et en particulier de GAG253, toujours présent dans le mélange, en raison de son immunogénicité chez l'homme.

20 La composition de ce mélange, dans laquelle Pam représente un motif dérivé de l'acide palmitoïque et Ac le groupe acétyl, est la suivante:

GAG 17 EKIRLRPGGKKKYKLKHIV K(Pam)-NH₂
 GAG 253 NPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILD K(Pam)-NH₂
 25 POL 325 AIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDDLY K(Pam)-NH₂
 NEF 66 VGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGL K(Pam)-NH₂
 NEF 116 HTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWLYKL K(Pam)-NH₂
 TT Ac-QYIKANSKFIGITELKK K(Pam)-NH₂

L'ensemble de ces peptides a été synthétisé comme indiqué dans les exemples précédents. Le mélange des solutions a été réalisé sur un échantillon de 5 mg de chaque peptide, dissous à une concentration de 20 mg/ml dans l'acide acétique à 80% puis mélangé
 5 dans l'ordre suivant : 1 : GAG17; 2 : NEF66; 3 : NEF 116; 4 : TT; 5 : GAG253 ; 6 : POL 325.

Les rendements de l'opération de filtration des solutions acide acétique concentrées, suivie d'une dilution par l'eau se sont avérés comparables aux rendements observés pour les mêmes opérations avec
 10 le mélange CK3 (à la précision du dosage près). L'homogénéité des solubilités et de comportements vis-à-vis de la filtration stérilisante en dépit des hétérogénéités de comportement chimique au stade individuel traduit la formation de micelles mixtes.

EXEMPLE 4:

15 Préparation d'un mélange de lipopeptides dérivés de l'antigène LSA3 en vue d'un essai pré-clinique de vaccination contre le stade intrahépatique de *Plasmodium falciparum*, réalisé chez la souris et le chimpanzé, puis d'un essai clinique chez l'homme.

20 LSAE CT1 LLSNIEEPKENIIDNLLNNIK(Pam)-NH₂

LSA3 NRI Ac-DELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQK(Pam)-NH₂

LSA3 NRII Ac-LEESQVNDDIFNSLVKSVQQEQQHNVK(Pam)-NH₂

LSA3 RE K(Pam)VESVAPSVEESVAPSVEESVAENVEESVAENV-NH₂

L'ensemble de ces peptides a été synthétisé comme indiqué
 25 dans l'exemple 1. Le mélange des solutions a été réalisé sur un

échantillon de 5 mg de chaque peptide préalablement dissous à une concentration de 20 mg/mL dans de l'acide acétique à 80% puis mélangés dans l'ordre suivant : 1 LSA3 NRI; 2:LSA3 NRII; 3:LSA3 CT1; 4: LSA3 RE. Les rendements de l'opération de filtration des solutions d'acide acétique concentrées, suivie d'une dilution par l'eau, se sont avérés comparables pour tous les lipopeptides.

EXEMPLE 5:

Etude de la réponse immunitaire chez l'homme après injection de micelles du lot CK9.

1. Matériels et méthodes

Micelles utilisées:

Les micelles qui ont été injectées ont été obtenues tel que décrit dans l'exemple 1 pour le lot CK9.

Peptides longs et peptides courts.

Les peptides longs suivants correspondant aux lipopeptides immunogènes ont été synthétisés (les positions des acodes aminés sur les protéines NEF, GAG et ENV sont indiquées entre parenthèses) : N1 (NEF 66 à 97), N2 (NEF 117 à 147), N3 (NEF 182 à 205), G1 (GAG 183 à 214), G2(GAG 253-284) et E (ENV 303 à 335).

Les peptides courts suivants recouvrant les séquences des lipopeptides, déjà connus pour être des épitopes CTL minimaux, ont été synthétisés par Neosystem (Strasbourg, France):

NEF 121-128, NEF 137-145, NEF 184-191 et NEF 195-202 restreints à HLA-A1.

NEF 136-145, NEF 190-198 et GAG 183-191 restreints à HLA-A2.

NEF 73-82, NEF 84-92 et EBN 416-424 HLA restreints à HLA-A11.

NEF 90-97 et NEF 182-189 restreints à HLA-B8.

NEF 134-141 et GAG 263-272 restreints à HLA-B27.

5 NEF 135-143 restreints à HLA-B18.

Protocole d'immunisation :

Des volontaires ont été immunisés par injection souscutanée des
10 micelles, ou des six lipopeptides correspondant, en présence d'adjuvant QS21. Les lipopeptides ou les micelles ont été injectés de manière différente en fonction des individus.

Les volontaires V4.6, V4.15, V4.16, V4.17, V4.18 et V4.28 ont été immunisés avec les six lipopeptides sous forme de micelles.

15 Le volontaire désigné V4.6 a reçu 250 µg de chacun des lipopeptides.

Les volontaires désignés V4.15, V4.16, V4.17, V4.18 et V4.28 ont été immunisés avec 500 µg de chacun des six lipopeptides.

Les volontaires V4.5, V4.1, V4.19, V4.21, V4.32 et V4.34 ont été
20 immunisés avec les six lipopeptides en présence d'adjuvant QS21.

Le volontaire V4.5 a reçu 100 µg des 6 lipopeptides, tandis que les volontaires V4.1, V4.19, V4.21, V4.32 et V4.34 ont reçu chacun 500µg des six lipopeptides.

Tous les volontaires ont été immunisés trois fois avec le mélange
25 des six lipopeptides, les deux dernières injections étant effectuées 4 semaines et 16 semaines respectivement après la première injection.

Des échantillons de sang ont été collectés après la première injection (appelé ci-après semaine 0) et 20 semaines après la première injection (semaine 20).

30 Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) et le sérum ont été isolés par des méthodes classiques, et ont été congelés.

Détection par ELISA des anticorps anti-peptides du VIH, de type immunoglobuline G (IgG).

5 Des puits de plaques de polystyrène ont été recouverts avec 5 µg/ml des peptides (N1, N2, N3, G1, G2 ou E) durant une nuit à 4°C. La saturation a été effectuée à l'aide d'une solution de PBS contenant 0,1% de Tween 20 et 3% de sérum albumine bovine (BSA). Des sérums dilués (1/100) ont été incubés dans les puits recouverts durant une nuit à 4°C
10 et les anticorps liés ont été détectés à l'aide d'IgG de chèvre anti-humain conjuguées à de la phosphatase alcaline (1/5000, Sigma). L'activité phosphatase a été mesurée en utilisant le 4-méthyl-umbelliferyl phosphate comme substrat (Sigma), et la mesure de la fluorescence a été effectuée à 360/460 nm dans un Cytofluor 2300 (Millipore).

15

Mesure des réponses cellulaires T dirigées à l'encontre de peptides du VIH.

Des PBMC (10^5 par puits) ont été cultivés dans un milieu complet
20 avec 1 µg/ml ou 0,2 µg/ml de peptides solubles (N1, N2, N3, G1, G2 ou E). La prolifération a été déterminée après 5 jours de culture en ajoutant 1µCi/puits de thymidine tritiée (NEN, Paris) 12 heures avant leur récolte.

La capacité des PBMC à proliférer in vitro a été vérifiée à l'aide de cultures indépendantes effectuées durant 5 jours avec de la
25 phytohémaglutinine A (PHA) du PPD (Tuberculin purified derivate Référence Statens Serum Institute n°2390) de la toxine tétanique (TT) et du SEB (Entérotoxine B du staphylocoque doré, Référence SIGMA S4881), respectivement à 1 µg/ml et 10µg/ml.

L'élimination des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ des PBMC a été
30 effectuée à l'aide d'immunoglobulines anti-souris et par activation du complément. En résumé 10^7 PBMC ont été incubés dans 1 ml de milieu dépourvu de sérum albumine bovine durant 30 minutes à 4°C avec 2 µg d'anticorps monoclonaux OKT4 ou OKT8 (Orthodiagnostic Systems).

1 ml de complément de sérum de lapin dilué (Hoechst Behring,
35 RUEIL, FRANCE) a été ajouté durant 45 minutes à 37°C. La suspension

cellulaire a été lavée deux fois afin d'éliminer le complément non lié. Les cellules resuspendues ont été analysées en utilisant la cytométrie de flux. L'analyse des phénotypes à l'aide d'anticorps anti-CD4⁺ et anti-CD8⁺ a été effectuée afin de vérifier l'enrichissement. Finalement les
5 cellules résultant de l'élimination des cellules CD4⁺ et CD8⁺ ont été testées dans un test de prolifération.

Obtention de lignées cellulaires CTL

10 La stimulation in vitro des PBMC a été effectuée en mélangeant 10⁶ PBMC (cellules répondantes) avec 10⁶ cellules stimulantes irradiées (PBMC autologues incubées pendant 2 heures avec différents peptides) dans du milieu de culture RPMI complet (RPMI 1640 complété avec 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, L-glutamine 2mM,
15 pyruvate de sodium 1 mM, Hepes 10 mM, des acides aminés non essentiels et 10% de sérum albumine bovine inactivée par la chaleur).

10 U/ml d'Interleukine-2 ont été ajoutés après 3 jours. Les cellules répondantes ont été restimulées chaque semaine durant 3 ou 4 semaines à l'aide de peptides incubés avec des PBMC autologues
20 (préparés de la même manière qu'au jour 0), dans un milieu complémenté avec 10 U/ml d'Interleukine-2. Après 3 ou 4 stimulations, les cellules CTL ont été testées en utilisant comme cible la lignée cellulaire autologue EBV incubée durant la nuit avec 10 µg des différents peptides (N1, N2, N3, G1, G2 ou E) pour 10⁶ cellules.

25 Pour obtenir des cellules cibles présentant les produits du gène HIV, des cellules cibles EBV ont été infectées, à raison de 10⁶ cellules/ml avec un virus de la vaccine de type sauvage (WT) ou avec des virus de la vaccine recombinants HIV-1/LAI, HIV-1/MN, HIV/A ou HIV/ROD NEF, durant une nuit (20PFU/cellules).

30 Les différentes cellules cibles ont été ensuite lavées et marquées avec 100 µCi de Na₂ ⁵¹CrO₄ (NEN Life Science Products, Les Ulis, France).

L'activité cytolytique a été mesurée dans un test de relarguage du ⁵¹Cr, durant 4 heures. Le relarguage spontané moyen n'excède pas 20%
35 de l'incorporation totale de ⁵¹Cr.

Les résultats sont exprimés de la manière suivante:

relarguage spécifique du chrome = $100 \times (\text{nombre de coups mesurés} / \text{nombre de coups spontanés par minute}) / (\text{nombre maximum de coups par minute} - \text{nombre de coups spontanés par minute})$.

L'élimination des cellules CD4⁺ ou CD8⁺ à partir des PBMC a été effectuée comme décrit ci-dessus.

10

Test ELISPOT Interféron- γ

Des plaques de nitrocellule de 96 puits (MultiScreen-HA, Millipore S.A., Molsheim, France) ont été recouvertes avec 5 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps de souris anti-Interféron- γ humain, en tant qu'anticorps de capture (Genzyme Corporation, Cambridge, Massachusetts, USA) durant une nuit à 4°C.

Après lavage, les puits ont été saturés avec du milieu complet RMPI et des PBMC récemment isolées, ou conservées au froid, ont été ajoutées (2×10^5 cellules par puits) avec différents peptides correspondant à des épitopes minimaux CD8⁺ (10 $\mu\text{g/ml}$).

Après 24 heures d'incubation à 37°C dans un incubateur (5% de CO₂), les plaques ont été lavées et incubées durant 2 heures avec 100 μl d'anticorps polyclonaux de lapin anti-interféron- γ humain (1/250, Genzyme). Après lavage, un conjugué anti-IgG de lapin-biotine (1/500, Boehringer Mannheim France S.A., Meylan, France) a été incubé durant 1 heure. Finalement, de l'extravidine marquée par de la phosphatase alcaline (Sigma-Aldrich Chimie S.A.R.L. St-Quentin Fallavier, France) a été ajoutée durant 1 heure.

100 μl de substrat chromogénique de la phosphatase alcaline (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ont été ajoutés pour développer les tâches. Les tâches bleues ont ensuite été comptées en utilisant un microscope.

Le témoin négatif consiste en des PBMC incubées seules dans le milieu, ou incubées avec un peptide correspondant à un épitope CD8⁺ dérivé du virus VIH présenté par des HLA adaptés.

Le témoin positif consiste à activer des PBMC avec 50 mg/ml de
5 PMA (Phorbol myristate acétate, référence SIGMA P 8139) et 500 ng/ml d'ionomycine (100 à 300 PBMC par puits ont été ajoutées).

Cette forte stimulation mitogène permet de mesurer la viabilité des lymphocytes T, et de vérifier ainsi la qualité de leur conservation au froid.

10 2. Résultats

Tolérance du traitement.

Les effets secondaires résultant de l'injection des lipopeptides ont
15 été peu conséquents. On a observé une réaction épidermique à l'endroit de l'injection. Les réactions locales consistent en de petits érythèmes qui ne durent plus de 24 à 48 heures. En aucun cas ces effets n'ont été associés avec des symptômes systémiques. Ces observations indiquent que les lipopeptides sont bien tolérés chez les individus normaux.

20

Induction spécifique d'une réponse humorale à l'encontre des peptides du VIH-1

Des échantillons de sérum ont été collectés avant le début de la
25 vaccination (semaine 0) et à la vingtième semaine, après la troisième injection.

Les sérums des volontaires immunisés ont été testés par ELISA pour la présence d'anticorps IgG dirigés à l'encontre des peptides de NEF (N1, N2, N3), GAG (G1, G2) et d'ENV (E).

30 Aucune IgG spécifique des peptides du VIH n'a été détectée avant l'injection chez les douze sujets présentés dans le tableau 14.

A la vingtième semaine, des anticorps IgG anti-N1 ont été détectés seulement dans cinq des sujets vaccinés (V4.6, V4.28, V4.1 (SQ21), V4.32(QS21) et V.4.34 (QS21)), et des anticorps IgG anti-N2
35 ont été détectés dans les sérums de dix des sujets, parmi les douze

vaccinés. Aucun anticorps de type IgG anti-N3 n'a été détecté. Le titre en anticorps anti-N2 est négatif dans les sérums des individus V4.17 et V4.18. Le titre en anticorps est trois à cinq fois supérieur au témoin négatif dans les sérums de V4.15, V4.16, V4.1(QS21) V4.5 (QS21) et V4.21(QS21). Le titre en anticorps est de 5 à 10 fois supérieur à celui du témoin négatif pour les sérums des individus V4.6, V4.19(QS21) et V4.28. Finalement, les sérums des patients V4.32(QS21) et V4.34 (QS21) présentent un titre en anticorps au moins 10 fois supérieur à celui du témoin négatif.

Après 3 injections aucun anticorps IgG anti-G1 n'a été détecté, mais les anticorps IgG anti-G2 ont été détectés dans les sérums des 12 individus vaccinés. Le titre en anticorps anti-G2 est 2 à 3 fois supérieur au témoin négatif pour le patient V4.18(QS21), le titre en anticorps est 5 à 10 fois supérieur au témoin négatif pour les individus V4.16, V4.17, V4.5(QS21), et V4.19(QS21) et V4.21(QS21). Les sérums des patients V4.6, V4.15, V4.28, V4.1(QS21), V4.32(QS21) et V4.34(QS21) ont un titre en anticorps plus de dix fois supérieur au témoin négatif. Les sérums de 6 des 12 individus testés, V4.28, V4.1(QS21), V4.5(QS21), V4.19(QS21), V4.32(QS21) et V4.34(QS21) contiennent des anticorps anti-E spécifiques.

Réponse T cellulaire auxiliaire spécifique des peptides du virus VIH-1.

Les réponses prolifératives vis-à-vis des peptides solubles obtenus avec les cellules PBMC des différents individus vaccinés apparaissent sur le tableau 15.

Les peptides NEF, GAG et ENV entraînent une prolifération chez les PBMC de donneurs seulement, après la vaccination. Les PBMC d'individus immunisés avec les lipopeptides (avec ou sans l'adjuvant QS21) prolifèrent au moins à l'encontre d'un peptide après 20 semaines (4 semaines après la troisième injection, pour 8 sujets sur 10 présentés dans le tableau 15).

Aucune prolifération n'est observée pour les PBMC des individus V4.15 et V4.17.

Les PBMC de l'individu V4.6 prolifèrent en réponse aux peptides N3, G1 et G2 avec un index de prolifération compris entre 4 et 10. Une induction de la prolifération en réponse à G1, G2 et E est observée avec les PBMC de l'individu V4.16 Des PBMC de l'individu V4.28 sont capables de proliférer en réponse aux peptides N1, N3, G2 et E. Une réponse proliférative, à l'encontre des peptides N1, G2 et E est observée pour les PBMC de l'individu V4.5 vacciné.

Une forte prolifération est observée en réponse aux peptides N1, G2 et E avec les PBMC de l'individu V4.19 (QS21), qui sont par ailleurs aussi capables de proliférer en présence de N2 et N3.

Les PBMC de l'individu V4.21 prolifèrent en présence de N1 et de G2, tandis que ceux de l'individu V4.32 prolifèrent seulement en présence de G2.

Une réponse proliférative est observée en présence de N1, N3, G2 et E avec les PBMC de l'individu V4.34 (QS21).

De manière globale la troisième immunisation avec les lipopeptides induit une réponse proliférative à l'encontre du peptide N1 pour cinq des dix sujets traités, à l'encontre de N2 pour un des dix sujets traités, N3 pour quatre des dix sujets traités, G1 pour deux des dix sujets traités, G2 pour huit des dix sujets traités et finalement E pour des cinq des dix sujets traités.

Les expériences d'élimination effectuées avec les PBMC de différents individus vaccinés montrent que la prolifération des PBMC récupérés après vingt semaines se fait préférentiellement par l'intermédiaire des cellules T CD4⁺ auxiliaires.

Induction de l'activité CTL spécifique du VIH

Les PBMC obtenues avant et après les immunisations ont été stimulées in vitro et testées pour leur activité CTL spécifique du VIH.

Les résultats d'expérimentations représentatives sont présentés dans le tableau 16.

L'activité CTL spécifique a été testée à l'encontre de la lignée cellulaire EBV autologue, incubée avec ou sans les peptides NEF, GAG, ENV. Aucune réponse anti-HIV a été détectée avec les PBMC

récupérées avant l'immunisation. Une activité spécifique CTL a été détectée chez les PBMC collectées trois semaines après l'immunisation chez neuf des douze individus.

Le tableau 16 résume l'activité cytotoxique de huit des individus vaccinés, l'activité d'un autre de ces individus étant représentée sur la figure 12.

Au moins un peptide contenu dans le vaccin lipopeptidique induit des cellules effectrices CTL spécifiques reconnaissant des peptides HIV.

Par exemple les PBMC de l'individu V4.6 reconnaissent dans un test cytotoxique les cellules EBV autologues impulsées avec les peptides G2 et E. Les PBMC de l'individu V4.16 reconnaissent le peptide N3 et E. Le pourcentage de lyse est variable, faible pour l'individu V4.16 reconnaissant le peptide N3, intermédiaire pour l'individu V4.18 avec le peptide N1 et fort pour l'individu V4.5(QS21) avec les peptides N2 et G2.

On notera qu'une activité CTL spécifique était aussi générée à l'encontre de peptides contenant un épitope minimal CD8⁺ HIV (individus V4.16 et V4.28).

Afin d'évaluer si les cellules effectrices sont des cellules T CD8⁺, comme on peut s'y attendre pour des CTL spécifiques d'antigènes restreints de classe I, les lymphocytes T CD8⁺ ou CD4⁺ ont été éliminés des PBMC et on a effectué un test de cytotoxicité.

Dans les expériences représentatives effectuées avec des PBMC de l'individu V4.1 (figure 12), on a observé une lyse efficace des cellules EBV autologues incubées avec des peptides du VIH, pour les PBMC et les cellules CD8⁺. L'enrichissement en cellules CD8⁺ permet d'augmenter le pourcentage de lyse spécifique. Ces résultats confirment que l'activité cytotoxique anti-HIV passe par l'intermédiaire des cellules T CD8⁺.

Il était aussi important de déterminer si ces cellules T cytotoxiques (CTL) reconnaissent et lysent des cellules infectées par des virus.

Aussi des PBMC de l'individu V4.5 collectées 20 semaines après l'immunisation, et stimulées in vitro avec le peptide N2 ont été testées pour leur activité CTL à l'encontre de cibles autologues infectées avec différents virus exprimant la protéine NEF recombinante. Les résultats d'expériences représentatives sont présentés dans la figure 13. Des CTL

anti-peptide N2 obtenues à partir de l'individu V4.5 (QS21) reconnaissent un antigène naturellement modifié par des EBV-LCL autologues infectées par des virus recombinants de la vaccine codant des gènes HIV-NEF obtenus à partir de différentes souches de HIV.

5 Pour le même rapport effecteur/cible, les CTL spécifiques du virus HIV reconnaissent NEF-LAI et NEF-MN avec la même efficacité. Un pourcentage plus faible de lyse spécifique est obtenu pour la protéine NEF-A ou la protéine NEF-ROD.

10 Ces résultats indiquent que les CTL obtenues après vaccination par des lipopeptides sont capables de reconnaître différentes souches du virus VIH.

Cellules T CD8⁺ sécrétant ex-vivo de l'Interféron- γ ,
spécifiques du virus VIH.

15

Les cellules effectrices T CD8⁺ peuvent exercer une activité lytique et/ou produire des lymphokines. Aussi la quantité de cellules T CD8⁺ sécrétant de l'Interféron- γ a été évaluée par un test ELISPOT spécifique.

20

Une étude récente a montré que l'inactivation intracellulaire du virus de l'hépatite B se fait par l'intermédiaire de cellules T CD8⁺ sécrétant de l'Interféron- γ spécifiques et cytotoxiques, qui induisent une immunité protectrice. Cette approche permet d'identifier des épitopes de cellules T CD8⁺ minimaux par sensibilisation de PBMC avec des peptides courts. Tous les peptides courts utilisés sont déjà décrits

25

comme étant des épitopes CTL (voir plus haut).

On a aussi quantifié par un ELISPOT ex vivo le nombre de cellules T CD8⁺ sécrétant de l'Interféron- γ spécifique des peptides du VIH dans des PBMC de sujets vaccinés (tableau 17).

30

Conclusion

Cette étude a permis de montrer qu'un vaccin lipopeptidique sous forme de micelles, et dépourvu d'adjuvant, contenant différents épitopes VIH, contenu dans les protéines virales NEF, GAG et ENV du virus VIH, est capable d'induire une forte et persistante réponse multiépitopique B

35

et T chez l'homme.

TABLEAU 1: Epitopes de BCR-ABL

Peptide	Séquence	Fixation au HLA
247-255	EDAEINPRF	B44
488-496	SELDLEKGL	B44..
768-776	DELEAVPNI	B44
901-934 b2a2	KEDALQRPV	B44
902-935 b2a2	EDALQRPVA	B44
986-994	GEKLRVLGY	B44
1176-1184	EDTMEVEEF	B44
1252-1260	MEYLEKKNF	B44
1691-1699	NEEAADDEVF	B44
49-57	VNQERFRMI	B8
580-588	LFQKLASQL	B8
722-730	ARKLRHVFL	B8
786-794	ALKIKISQI	B8
886-893	CVKLQTVH	B8
928-936 b3a2	KALQRPVAS	B8
1830-1838	GAKTKATSL	B8
1975-1983	IQQMRNKFA	B8
1977-1984	QMRNKFAF	B8
252-260	NPRFLKDNL	B7
329-338	TPDCSSNENL	B7
693-701	TPRRQSMTV	B7
1058-1066	SPGQRSISL	B7
1196-1205	HPNLVQLLGV	B7
1560-1569	SPKPSNGAGV	B7
1717-1725	KPLRRQVTV	B7
1878-1884	SPAPVPSTL	B7
36-44	ERCKASIRR	B27
71-79	DRQRWGGFR	B27
575-583	QRVGDLFQK	B27

TABLEAU 1: Epitopes de BCR-ABL

Peptide	Séquence	Fixation au HLA
834-842	FRVHSRNGK	B2/
642-650	LLYKPVD RV	A2
684-692	FLSSINEEI	A2
708-716	QLLKDSFMV	A2
714-722	FMVELVEGA	A2
817-825	KLSEQESLL	A2
881-889	MLTNSCVKL	A2
908-917	GLYGFLNVIV	A2
912-920	FLNVTVHSA	A2
1240-1248	VLLYMATQI	A2
1903-1911	FIPLISTRV	A2
1932-1940	VVLDSTEAL	A2
50-58	NQERFRMIY	A1
223-231	VGDASRPPY	A1
549-558	KVPELYEIHK	A3/A11
583-591	KLASQLGVY	A3/A11
715-724	MVELVEGARK	A3/A11
916-923	IVHSATGFK	A3/A11
920-928 b3a2	ATGFKQSSK	A3/A11
924-932 b3a2	KQSSKALQR	A3/A11
1156-1165	EVYEGVWKKY	A3/A11
1311-1320	SLAYNKFSIK	A3/A11
1499-1509	NLFSALIKK	A3/A11
1724-1734	TVAPASGLPHK	A3/A11
1905-1914	LISTRVSLRK	A3/A11
1922-1930	RIASGAITK	A3/A11
924-936 b3a2	KQSSKALQRPVAS	DR4

TABLEAU 2 - Epitopes de la p53

	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-A1:</u>
5	RVEGNLARVEY (196-205)
	GSDCTTIHY (226-234)
	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-A2:</u>
	LLPENNVLSPL (25-35)
	RMPEAAPPV (65-73)
10	RMPEAAPRV
	ALNKMFCQL (129-137)
	STPPPGTRV (149-157)
	GLAPPQHLIRV (187-197)
	LLGRNSFEV (264-272)
15	PLDGEYFTL (322-330)
	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-A3:</u>
	RVRAMAIYK (156-164)
	RRTEENLR (282-290)
	ELPPGSTKR (298-306)
20	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-B7:</u>
	LPENNVLSPL (26-35)
	APRMPEAAPPV (63-73)
	APRMPEAAPRV
	APPQHLIRV (189-197)
25	RPILTIITL (249-257)
	KPLDGETYFTL (321-330)
	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-B8:</u>
	CQLAKTCPV (135-143)
	GLAPPQHLL (187-195)
30	NTRHRSVVV (210-218)
	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-B51:</u>
	LLPENNVLSPL (25-35)
	RMPEAAPPV (65-73)
35	LIRVEGNLRV (194-203)

TABLEAU 3**Epitopes des protéines E₆ et E₇**

5	YMLDLQPETT (E7 11-20)
	LLMGTLGIV (E7 82-90)
	TLGIVCPI (E7 86-93)
	TIHDIILECV (E6 29-38)
	KLPQLCTEL (E6 18-26)
10	RPPKLPQL (E6 8-15)
	LRREVDFAFRDLCIVYRDGNPY (E6 45-67)
	ISEYRHYCY (E6 80-88)
	EKQRHLDKKQRFHNIRGRWT (E6 121-140)
	GQAEPDRAHYNIVTF (E7 43-57)
15	QAEPDRAHY (E7 44-52)
	EPDRAHYNIV (E7 46-55)

TABLEAU 4: Epitopes du virus VIH-1HLA-A1

(Nef 96-106: GLEGLIHSQRR
 (Nef 121-128: FPDWQNYT
 (Nef 137-145: LTFGWCYKL
 (Nef 184-191: RFDSRLAF
 (Nef 195-202: ARELHPEY :

HLA-A2

Gp120 121-129: KLTPLCVTL
 P17 77-85: SLYNTVATL
 RT 200-208: ALVEICTEM
 RT 275-285: VLDVGDAYFSV
 RT 346-354: KTYQYMDDL
 RT 368-376: KIEELRQHL
 RT 376-387: LLRWGLTTPDK
 RT 476-484: ILKEPVHGV
 RT 588-596: PLVKLWYQL
 RT 683-692: ELVNQDEQL
 Nef 136-145: PLTFGWCFKL
 Nef 180-189: VLOWRFDSRL
 Nef 190-198: ALHHVAREL
 Gp41 818-826: SLLNATVDI
 P24 185-193: DLNTMLNTV
 RT 346-354: VIYQYMDDL
 RT 588-596: PLVKLWYQL
 Pro 143-152: VLVGPTPVNI
 (Gp120 37-44: TVYGVVPV
 (Gp120 115-122: SLKPCVKL
 (Gp120 313-321: RIQRGPGRA
 (Gp120 197-205: TLTSCNTSV
 (Gp120 428-435: FINMWQEV
 (Gp41 836-844: VVQGAYRAI
 (p24 219-228: HAGPIAPGQM
 (p15 422-431: QMKDCTERQA
 (p15 448-456: FLQSRPETA
 (RT 681-691: ESELVNQIEG

TABLEAU 4: Epitopes du virus VIH-1 (suite)HLA-A3

P17 18-26: KIRLRPGGK
 P17 20-28: RLRPGGKKK
 RT 200-210: ALVEICTEMEK
 RT 325-333: AIFQSSMTK
 RT 359-368: DLEIGQHRTK
 Nef 73-82: QVPLRPMTYK
 Gp120 37-46: TVYYGVPVVK
 Gp41 775-785: RLRDLLLLIVTR
 P17 18-26: KIRLRPGGK

HLA-A11

RT 325-333: AIFQSSMTK
 RT 507-517: QYQEPFKNLK
 Nef 73-82: QVPLRPMTYK
 Nef 84-92: AVDLSHFLK
 p24 349-359: ACQVGPGPHK
 P17 83-91: ATLYCVHQR

HLA-A24 (A9)

Gp120 52-61: LFCASDAKAY
 Gp41 591-598: YLKDQQLL
 ou 590-597: RYLKDQQLL
 (RT 484-492: VYYDPSKDL
 (RT 508-516: IYQEPFKNL
 (RT 681-691: ESELVNQHEG

HLA-A25 (A10)

P24 203-212: ETNEEAAEW

HLA-A26 (A10)

P24 167-175: EVIPMFSAL

HLA-A30 (A19)

(Gp41 845-852: RAIRHIPRR

HLA-A31 (A19)

Gp41 775-785: RLRDLLLLIVTR

HLA-A32 (A19)

Gp120 424-432: RIKQIINMW
 Gp41 774-785: HRLRDLLLLI
 RT 559-568: PIKETWETV

TABLEAU 4: Epitopes du virus VIH-1 (Suite)HLA-A33 (A19)

(P24 266-275: IILGLNKIVR

HLA-B7

RT 699-707: YLAWVPAHK
 Nef 68-77: FPVTQVPLR
 Nef 128-137: TPGPGVRYPL
 Gp120 303-312: RPNNNTRKSI
 Gp41 848-856: IPRRIRQGL
 RT 699-707: YLAWVPAHK

HLA-B8

Gp120 2-10: RVKEKYQHL
 P17 24-32: GGKKKYKLL
 Nef 90-97: FLKEKGGL =
 P24 259-267: GEIYKRWI
 Gp41 591-598: YLKDQQL
 (Gp41 849-856: PRRIRQGL
 ou 851-859: RIRQGLERIL
 (P24 329-337: DCKTILKAL
 (RT 185-193: GPKVKQWPL
 (Nef 182-189: EWRFDSSL :

HLA-B14

Gp41 589-597: ERYLKDQQL
 P24 298-306: DRFYKTLRA
 (P24 183-191 ? : DLNTMLNTV
 (P24 304-313: LRAEQASVQEV
 (P24 305-313: RAEQASVQEV

HLA-B18

Nef 135-143: YPLTFGWCY
 Nef 135-143: YPLTFGWCF

TABLEAU 4: Epitopes du virus VIH-1HLA-B27

P24 263-272: KRWTILGLNK
 Nef 73-82: QVPLRPMTYK
 Nef 134-141: RYPLTFGW
 ou 133-141: YPLTFGW
 Gp41 589-597: ERYLKDQQL
 (Gp41 791-800: GRRGWEALKY)

HLA-B35

Gp120 78-86: DPNPQEVVL
 Gp120 257-265: RPVVSTQLL
 RT 285-294: VPLDKDFRKY
 RT 323-331: SPAIFQSSM
 RT 342-350: NPDIIVTYQY (consensus clade B)
 RT 460-468: IPLTEEAEL
 RT 598-608: EPIVGAETFY
 Nef 66-76: FPVVRPQVPL
 Nef 74-81: VPLRPMTY
 Gp41 611-619: TAVPWNASW
 Gp120 42-52: VPVWKEATTTL
 P17 124-132: NSSQVVSQNY (consensus clade B)
 P24 254-262: PPIPVGEIY (consensus clade B)

HLA-B37

Nef 120-128: YFPDWQNYT

HLA-B44 (B12)

P24 178-186: SEGATPQDL
 (p24 175-184: LESGATPQDL)

TABLEAU 4: Epitopes du virus VIH-1HLA-B51 (B5)

gp41 562-570: RAIEAQQHL
 RT 200-208: ALVEICTEM
 RT 209-217: EKEGKISKI
 RT 295-302: TAFTPSI

HLA-B52 (B5)

Nef 190-198: AFHHVAREL

HLA-B55 (B22)

Gp120 42-51: VPVWKEATTTL

HLA-B57 et B58 (B17)

P24 240-249: TSLTQEQIGW
 Nef 116-125: HTQGYFPDWQ
 ou 116-124: HTQGYFPDW -
 Nef 120-128: YFPDWQN
 (P24 147-155: ISPRTLNAW
 (P24 164-172: FSPEVIPMF

HLA-Bw62 (B15)

P17 20-29: RLRPGGKKKY
 P24 268-277: LGLNKIVRMY
 RT 427-438: LVGKLNWASQIY
 Nef 84-91: AVDLSHFL
 Nef 117-127: TQGYFPDWQNY

HLA-Cw4

gp120 380-388: SFNCGGEFF

HLA-Cw8

RT 663-672: VTDSQYALGI
 P24 305-313: RAEQASQEV
 Nef 82-91: KAALDLSHPL

HLA-Cw?

P24 308-316: QATQEVKNW

TABLEAU 5 - Epitopes de Mélanome humain

Gene/protéine	MHC restriction	Peptide	Position des acides aminés
Tyrosinase	HLA-A2	MLLAVLYCL	1-9
	HLA-A2	YMNGTMSQV	369-377
		YMDGTMSQV	
	HLA-A24	AFLPWHRLF	206-214
	HLA-B44	SEIWRDIDF	192-200
	HLA-DR4	QNILLSNAPLGPQFP	56-70
		SYLQDSDPDSFQD	450-462
Pmel17 ^{gp100}	HLA-A2	KTWGQYWQV	154-162
	HLA-A2	AMLGHTMEV	177-186
	HLA-A2	MLGHTMEV	178-186
	HLA-A2	ITDQVPFSV	209-217
	HLA-2	YLEPGPVT	280-288
	HLA-A2	LLDGTATLRL	457-466
	HLA-A2	VLYRYGSFSV	476-485
	HLA-A2	SLADTNSLAV	570-579
	HLA-A3	ALLAVGATK	17-25
Melan-A ^{MART-1}	HLA-A2	(E)AAGIGILTV	26(7)-35
	HLA-A2	ILTVILGVL	32-40
gp ^{75TRP-1}	HLA-A31	MSLQRQFLR	
TRP-2	HLA-A31	LLGPGRPYR	197-205

TABLEAU 6: Epitopes de tumeurs résultant de mutations

Gene/proteine	Tumeur	MHC Restriction	Peptide	Position des acides aminés
MUM-1	Mélanome	HLA-B44	EEKLIVVLF	30-38
CDK4	Mélanome	HLA-A2	ACDPHSGHFV	23-32
β -catenine	Mélanome	HLA-A24	SYLDSGIHF	29-37
HLA-A2	carcinome rénal	-	-	-
CASP-8	carcinome squameux de la tête et du cou	HLA-B35	FPSDSWCYF	476-484

TABLEAU 7**Antigènes communs à diverses tumeurs**

Gene	tissu où a lieu l'expression normale	MHC restriction	Peptide antigénique	Position des acides aminés
MAGE-1	testicules	HLA-A1	EADPTGHSY	161-169
		HLA-Cw16	SAYGEPRKL	230-238
MAGE-3	testicules	HLA-A1	EVDPIGHLY	168-176
		HLA-A2	FLWGPRLV	271-279
		HLA-B44	MEVDPIGHLY	167-176
BAGE	testicules	HLA-Cw16	AARAVFLAL	2-10
GAGE-1/2	testicules	HLA-Cw6	YRPRPRRY	9-16
RAGE-1	rétine	HLA-B7	SPSSNRIRNT	11-20
GnTV	aucun	HLA-A2	VLPDVFIRC	38-64
mucine	seins lors de la lactation	pas de restriction	PDTRPAPGSTAPPA HGV TSA*	

* transcript aberrant de la N-acétyl glucosaminyl transferase V (GnTV) trouvé uniquement dans les mélanomes.

TABLEAU 8

LIPOPEPTIDES	RENDEMENT DE FILTRATION
NEF66	quantitatif
NEF117	80%
NEF182	quantitatif
GAG183	80%
GAG253	77%
ENV	quantitatif

TABLEAU 9

Peptide	Solvant	concentration (mg/mL)	Volume prélevé (mL)	Rendement de filtration(%) après mélange
NEF66	eau	5	1	95
NEF 117	AcOH 25%	5	1	81
NEF 182	AcOH 25%	5	1	92
GAG 183	AcOH 80%	10	0.5	73
GAG 253	AcOH 25%	5	1	31
ENV	eau	5	1	95

TABLEAU 10

Peptide	solvant	concentration (mg/ml)	volume prélevé (ml)	rendement de filtration (%) après mélange *
NEF 66	AcOH 80%	20	0,250	quantitatif
NEF 117	AcOH 80%	20	0,250	quantitatif
NEF 182	AcOH 80%	20	0,250	quantitatif
GAG 183	AcOH 80%	20	0,250	quantitatif
GAG 253	AcOH 80%	20	0,250	quantitatif
ENV	AcOH 80%	20	0,250	quantitatif

* à la précision du dosage près.

TABLEAU 11

peptide	pesée exacte*** (mg)	peptide net	quantité attendue* (µg par dose)	quantité*** obtenue (µg par dose)	rendement ** (%)
NEF 66	764	641	550	505+/-15	89.14 -94.6
NEF117	739	641	550	621+/- 21	109.08 - 116.72
NEF182	742	641	550	545+/- 16	96.23 - 102.05
GAG183	741	642	550	478+/-13	84.50 - 89.23
GAG253	780	641	550	571+/- 28	98.76 - 108.95
ENV	810	642	550	593+/- 17	104.71 - 110.89

* la dose ciblée était de 500 µg par peptide; un surdosage de 10% a été délibérément prévu au moment de la pesée, compte tenu des rendements obtenus lors de la préparation du lot CK6.

**Les fourchettes des rendements reflètent la précision du dosage, et non une variation importante d'un flacon à l'autre.

*** Les valeurs en excès sont dues aux imprécisions des pesées de poudres électrostatiques par un opérateur revêtu du scaphandre standard.

TABLEAU 12 - Essai uniformité de teneur

	nef 66	nel 117 total	nel 182	gag 183	gag 253	env 303
échantillon 1	14,40	17,74	16,19	13,28	16,74	17,53
	14,38	17,75	16,21	13,27	17,27	17,63
	14,67	16,36	16,61	13,41	16,89	18,36
	14,49	17,28	16,34	13,32	16,97	17,84
	13,42	17,11	15,32	12,66	15,56	16,36
échantillon 2	13,81	17,04	15,32	12,67	15,89	16,51
	13,77	17,06	15,33	12,45	15,16	16,41
	13,67	17,07	15,32	12,59	15,54	16,43
	13,58	17,08	15,33	12,68	15,64	16,29
	13,70	17,08	15,31	12,62	15,82	16,28
échantillon 3	13,59	17,05	15,31	12,32	14,85	16,37
	13,62	17,07	15,32	12,54	15,44	16,31
	13,20	16,80	15,14	12,23	16,05	16,15
	14,53	17,34	15,74	13,06	15,93	17,17
	13,49	16,86	15,17	12,31	15,44	16,15
échantillon 4	13,74	17,00	15,35	12,53	15,80	16,49
	13,88	17,21	15,40	12,52	14,78	16,80
	13,94	17,17	15,39	12,59	15,20	16,72
	13,98	17,19	15,47	12,96	15,49	16,71
	13,94	17,19	15,42	12,69	15,16	16,74
échantillon 5	14,03	17,26	15,75	11,62	15,78	16,97
	13,99	17,20	15,73	11,39	15,77	17,02
	14,20	17,26	15,74	12,19	15,90	16,80

TABLEAU 12 -Essai uniformité de teneur (suite)

échantillon 6	14,07	17,24	15,74	11,73	15,81	16,93
	13,78	17,29	15,67	12,69	16,13	18,04
	13,94	17,22	15,57	12,67	16,40	17,50
	13,95	17,23	15,55	12,28	16,19	17,37
échantillon 7	13,89	17,25	15,60	12,55	16,24	17,64
	13,84	17,06	15,38	12,50	15,62	17,90
	13,65	17,09	15,45	12,44	16,02	17,73
	13,73	16,94	15,37	nd	16,21	17,54
échantillon 8	13,74	17,03	15,40	12,47	15,95	17,73
	14,03	17,40	15,66	12,77	16,46	18,56
	14,07	17,33	15,72	11,92	16,61	18,41
	13,89	17,39	15,72	12,68	15,94	18,37
échantillon 9	14,00	17,37	15,70	12,46	16,34	18,45
	13,34	16,88	15,33	12,07	14,70	17,92
	13,71	17,24	15,66	12,36	15,12	18,50
	13,53	16,93	15,44	12,28	14,44	18,01
échantillon 10	13,53	17,02	15,48	12,24	14,76	18,14
	13,72	17,22	15,64	12,41	14,89	18,32
	13,75	17,33	15,72	12,36	14,82	18,31
	13,67	17,21	15,72	11,86	14,61	18,69
échantillon 11	13,71	17,25	15,69	12,21	14,77	18,44
	13,62	17,11	15,60	12,28	14,75	18,42
	13,74	17,13	15,70	12,44	14,98	18,31
	13,75	17,16	15,63	12,51	15,37	18,32
échantillon 12	13,70	17,13	15,65	12,41	15,03	18,35
	13,32	16,36	14,74	12,47	16,17	15,44
	13,31	16,41	14,68	12,51	16,26	15,56
	13,34	16,38	14,67	12,53	16,17	15,43

TABLEAU 12 - Essai uniformité de teneur (suite)

échantillon 13	13,32	16,38	14,70	12,50	16,20	15,48
	13,76	16,72	14,75	12,67	16,10	15,59
	13,56	16,35	14,75	12,64	16,16	15,64
	13,60	16,67	14,76	12,64	16,06	15,64
échantillon 14	13,64	16,58	14,76	12,65	16,10	15,62
	13,36	16,40	14,53	12,48	15,90	15,64
	13,41	16,35	14,57	12,52	15,84	15,80
	13,44	16,43	14,50	12,46	15,77	15,60
échantillon 15	13,40	16,39	14,53	12,49	15,84	15,68
m	13,69	16,91	15,28	12,49	15,81	16,82
écart type	0,27	0,37	0,42	0,28	0,59	1,19
t's	0,58	0,79	0,89	0,59	1,24	2,51
min	13,11	16,12	14,39	11,91	14,57	14,30
max	14,27	17,70	16,18	13,08	17,05	19,33
t = 2,110	3 valeurs aberrantes sur échantillon 1 (erreur de dilution probable)					
essai uniformité de teneur						
min accepté (-15%)	11,64	14,37	12,99	10,62	13,44	14,29
max accepté (+15%)	15,74	19,45	17,58	14,37	18,18	19,34
écart observé	4,23%	4,67%	5,84%	4,70%	7,84%	14,95%

TABLEAU 13

Lignées CTL anti-7 peptides	Peptides reconnus	Petits peptides reconnus
92102	GAG 2466281	
92105	NEF 125-147	
92109	NEF 101-126	NEF 101-110 NEF 116-126
	NEF 125-147	NEF 128-136
	NEF 155-178	NEF 169-178
	NEF 201-225	NEF 215-225
	GAG 246-281	
92120	GAG 246-281	
92125	NEF 155-178	NEF 169-178
92129	NEF 125-147 NEF 155-178 NEF 201-225	NEF 128-136 NEF 169-178 NEF 201-211 NEF 211-219
92117	négative	
92127	NEF 101-126 NEF 125-147 NEF 155-178	

TABLEAU 14

Détection d'anticorps spécifiques de peptides des protéines
NEF, GAG et ENV du virus VIH, dans le sérum de volontaires
immunisés avec un mélange de six lipopeptides

	Volontaire ^a	Période de récupération	Peptide reconnu					
			N1	N2	N3	G1	G2	E
	V4.6	W20	2.1	7.2	1.0	1.0	10.2	1.2
10	V4.15	W20	1.3	4.8	1.2	1.3	11.2	1.5
	V4.16	W20	1.2	4.7	1.2	1.1	9.7	1.3
	V4.17	W20	1.7	1.8	1.0	1.1	8.0	1.2
	V4.18	W20	1.1	1.2	1.0	1.3	2.2	1.1
	V4.28	W20	7.8	8.8	1.5	1	15	5.7
15	V4.1 (QS21)	W20	3.1	3.2	1.1	1.2	11.5	4.7
	V4.5 (QS21)	W20	1.2	4.2	1.3	1.1	8.1	2.1
	V4.19(QS21)	W20	1.2	5.3	1.2	1.3	5.1	3.8
	V4.21(QS21)	W20	1.2	4.7	1.0	1.2	9.3	1.9
	V4.32(QS21)	W20	6.6	14	1.8	1.9	21	4
20	V4.34(QS21)	W20	7.1	21.2	1.2	1.8	36	8

^a Les volontaires ont été immunisés avec six lipopeptides sous forme de micelles, ou avec un adjuvant (QS21)

^b Les sérums des volontaires ont été récupérés avant injection des lipopeptides, et vingt semaines après. Les trois injections des six lipopeptides ont été administrés à 0.4 et 16 semaines.

^c La détection des anticorps spécifiques des peptides du virus VIH a été effectuée à l'aide d'un test ELISA avec une dilution de sérum de 1/100. Les plaques du test ELISA ont été recouvertes avec NEF66-97 (N1), NEF 117-147(N2), NEF 182-205 (N3), GAG 183-214 (G1), GAG 253-284 (G2) ou V3 ENV 303-335(E).

TABLEAU 15
Réponses prolifératives des PBMC des volontaires
aux lipopeptides NEF, GAG et ENV

	Volontaire ^a	période de récupération	Index de prolifération ^c			
			N1	N2	N3	G1
		W0	1.3	1.0	1.0	1.3
10	V4.6	W20	2.4	3.1(±1)	10(±7)	4.5(±1.1)
		W0	1.0	1.0	1.3	1.0
	V4.15	W20	1.9	2.2	1.6	1.2
		W0	1.0	1.2	1.3	1.3
15	V4.16	W20	1.1	1.1	2.2	4.6(± 0.6)
		W0	2.5	1.3	1.4	1.9
	V4.17	W20	1.5	1.1	1.6	2.0
		W0	1.0	1.3	1.5	1.8
	V4.18	W20	nd	nd	nd	nd
20		W0	1.3	2.2	1.7	1.2
	V4.28	W20	3.8(±0.6)	1.2	21(±2)	1.2
		W0	1.0	1.1	1.0	1.1

25

- ^a Les volontaires ont été immunisés avec six lipopeptides sous forme de micelles, ou avec un adjuvant (QS21)
- ^b Les PBMC des volontaires ont été récupérées avant injection des lipopeptides (W0) et au cours de la vingtième semaine (W20).
- ^c 2 10⁵ cellules ont été cultivées avec 1 µg/ml des lipopeptides du VIH et la prolifération a été mesurée par incorporation de la thymidine tritiée au jour 6. Les lipopeptides sont: N1, N2, N3, G1, G2 et E. L'index de prolifération obtenu avec le milieu de culture seul est égal à 1.
- ^d la réponse proliférative (cpm) des PBMC des volontaires cultivées dans le milieu seul est donnée. Tous les échantillons de PBMC ont proliféré en réponse à 1 µg/ml de PHA, PPD et SEB.

TABLEAU 15 (suite) (1)
Réponses prolifératives des PBMC des volontaires
aux lipopeptides NEF, GAG et ENV

Volontaire ^a	période de récupération	Index de prolifération ^c		
		G2	E	Prolifération induite par le milieu de culture ^d
V4.6	W0	1.0	1	871 (±25)
	W20	7.2(±0.7)	3.6(±0.9)	280 (±32)
V4.15	W0	1.4	1.5	1657 (±182)
	W20	1.6	2.1	252 (±30)
V4.16	W0	1.8	1.5	3830 (±232)
	W20	3.6(±0.5)	3.9(±0.7)	1000 (±168)
V4.17	W0	2.0	2.3	5708 (±470)
	W20	2.0	2.8	1228 (±54)
V4.18	W0	3.3(±0.7)	1.3	460 (±49)
	W20	nd	nd	nd
V4.28	W0	1.2	1.2	869 (±36)
	W20	8.2(± 1.6)	7.6(± 2.2)	2558 (±186)
	W0	1.0	1.0	3107 (±521)

^a Les volontaires ont été immunisés avec six lipopeptides sous forme de micelles, ou avec un adjuvant (QS21)

^b Les PBMC des volontaires ont été récupérées avant injection des lipopeptides (W0) et au cours de la vingtième semaine (W20).

^c 2 10⁵ cellules ont été cultivées avec 1 µg/ml des lipopeptides du VIH et la prolifération a été mesurée par incorporation de la thymidine tritiée au jour 6. Les lipopeptides sont: N1, N2, N3, G1, G2 et E. L'index de prolifération obtenu avec le milieu de culture seul est égal à 1.

^d la réponse proliférative (cpm) des PBMC des volontaires cultivées dans le milieu seul est donnée. Tous les échantillons de PBMC ont proliféré en réponse à 1 µg/ml de PHA, PPD et SEB.

TABEAU 15 (suite 2)
Réponses prolifératives des PBMC des volontaires
aux lipopeptides NEF, GAG et ENV

Volontaire ^a	période de récupération	Index de prolifération ^c			
		N1	N2	N3	G1
V4.1 (QS21)	W20	nd	nd	nd	nd
	W0	1.5	1.6	1.5	1.6
V4.5 (QS21)	W20	4.6(±1.2)	3.1(±0.3)	1.5	2.0
	W0	1.0	1.1	1.2	1.1
V4.19 (QS21)	W20	24.3(±3.1)	8.5(±5)	4.4(±1.2)	3.1(±2.5)
	W0	1.3	1.3	1.2	3.9(±1)
V4.21 (QS21)	W20	6.5(±3)	1.4	2.3	2.8
	W0	1.0	1.0	1.1	1.3
V4.32 (QS21)	W20	1.0	1.0	1.7	1.2
	W0	1.0	1.1	1.1	1.2
V4.34 (QS21)	W20	3.4(±0.2)	1.1	3.3(±0.1)	2.2
	W0				

^a Les volontaires ont été immunisés avec six lipopeptides sous forme de micelles, ou avec un adjuvant (QS21)

^b Les PBMC des volontaires ont été récupérées avant injection des lipopeptides (W0) et au cours de la vingtième semaine (W20).

^c 2 10⁵ cellules ont été cultivées avec 1 µg/ml des lipopeptides du VIH et la prolifération a été mesurée par incorporation de la thymidine tritiée au jour 6. Les lipopeptides sont: N1, N2, N3, G1, G2 et E. L'index de prolifération obtenu avec le milieu de culture seul est égal à 1.

^d la réponse proliférative (cpm) des PBMC des volontaires cultivées dans le milieu seul est donnée. Tous les échantillons de PBMC ont proliféré en réponse à 1 µg/ml de PHA, PPD et SEB.

TABLEAU 15 (suite) (3)
Réponses prolifératives des PBMC des volontaires
aux lipopeptides NEF, GAG et ENV

Volontaire ^a	période de récupération	Index de Prolifération ^c		
		G2	E	Prolifération induite par le milieu de culture ^d
V4.1 (QS21)	W20	nd	nd	nd
	W0	1.5	1.3	341 (±20)
V4.5 (QS21)	W20	3.9(±0.3)	5.0(±2.2)	776 (±60)
	W0	1.0	1.0	918 (±102)
V4.19 (QS21)	W20	11.0(±2.7)	9.4(±2.8)	497 (±168)
	W0	1.3	1.4	322 (±21)
V4.21 (QS21)	W20	11.3(±4)	3.3(±1.9)	1052 (±82)
	W0	1.2	1.2	4448 (±75)
V4.32 (QS21)	W20	10.1(±1.5)	0.9	245 (±30)
	W0	1.2	1.2	5383 (±309)
V4.34 (QS21)	W20	4.4(±0.6)	3.1(±0.1)	7381 (±280)

^a Les volontaires ont été immunisés avec six lipopeptides sous forme de micelles, ou avec un adjuvant (QS21)

^b Les PBMC des volontaires ont été récupérées avant injection des lipopeptides (W0) et au cours de la vingtième semaine (W20).

^c 2 10⁵ cellules ont été cultivées avec 1 µg/ml des lipopeptides du VIH et la prolifération a été mesurée par incorporation de la thymidine tritiée au jour 6. Les lipopeptides sont: N1, N2, N3, G1, G2 et E. L'index de prolifération obtenu avec le milieu de culture seul est égal à 1.

^d la réponse proliférative (cpm) des PBMC des volontaires cultivées dans le milieu seul est donnée. Tous les échantillons de PBMC ont proliféré en réponse à 1 µg/ml de PHA, PPD et SEB.

TABLEAU 16
Spécificité des CTL chez les volontaires immunisés

% de lyse spécifique des cellules

Lipo peptide incubé avec des cellules cibles	V4.6 ^a		V4.16		V4.18		V4.28	
	W0	W20	W0	W20	W0	W20	W0	W20
Rapport E/T	70/1		50/1		80/1		10/1	
Aucun	5%	11%	2%	12%	8%	14%	5%	8%
NEF 66-97	9%	17%	8%	18%	11%	40%	12%	19%
NEF 117-147	9%	16%	2%	13%	6%	6%	19%	12%
NEF 182-205	4%	15%	2%	24%	6%	6%	2%	4%
Rapport E/T	70/1		30/1		55/1		10/1	
Aucun	4%	18%	5%	5%	8%	6%	2%	2%
GAG 183-214	7%	14%	9%	10%	nd	nd	2%	2%
GAG 253-284	9%	49%	11%	20%	6%	26%	2%	2%

^a Les volontaires ont été immunisés avec six lipopeptides sous forme de micelles, ou avec un adjuvant (QS21)

^b Les cellules cibles sont des PBMC autologues sensibilisées avec 10 µM de chacun des lipopeptides, irradiées et marquées à l'aide de ⁵¹Cr.

^c Le test de relargage du chrome a été effectué après trois stimulations in vitro. L'activité cytotoxique à l'encontre des cellules autologues EBV incubées avec des peptides ou sans peptides a été mesurée dans un test de relargage de 4 heures. L'activité cytotoxique a été considérée comme positive quand le relargage du chrome est supérieur de 10% à celui observé avec les cellules cibles seules. A1 et A3 correspondent à des cellules EBV incubées avec un ensemble de peptides A1 (n 137-145, n195-202, n 184-191, n121-128 pour V4.16 ou n183-191, n121-128 pour V4.28) et le peptide A3 (n73-82).

^d Le rapport E/T (rapport cellules effectrices/cellules cibles) correspond à 5x10³ cellules cibles marquées, incubées avec des quantités variables de cellules effectrices

TABLEAU 16 (suite 1)
Spécificité des CTL chez les volontaires immunisés

% de lyse spécifique des cellules

Lipopeptide incubé avec des cellules cibles	V4.5 (QS21)		V4.19 (QS21)		V4.21 (QS21)		V4.34 (QS21)	
	W0	W20	W0	W20	W0	W20	W0	W20
Rapport E/T	100/1		60/1		40/1		35/1	
Aucun	16%	31%	2%	6%	2%	2%	10%	2%
NEF 66-97	10%	23%	0%	15%	2%	2%	2%	2%
NEF 117-147	18%	47%	2%	27%	2%	2%	2%	2%
NEF 182-205	10%	31%	0%	0%	2%	2%	2%	2%
Rapport E/T	140/1		60/1		46/1		35/1	
Aucun	23%	11%	0%	0%	2%	2%	2%	2%
GAG 183-214	21%	11%	0%	0%	2%	2%	2%	23%
GAG 253-284	20%	68%	0%	9%	2%	2%	5%	5%

^a Les volontaires ont été immunisés avec six lipopeptides sous forme de micelles, ou avec un adjuvant (QS21)

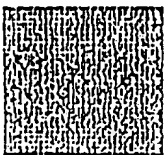
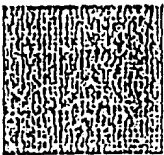
^b Les cellules cibles sont des PBMC autologues sensibilisées avec 10 µM de chacun des lipopeptides, irradiées et marquées à l'aide de ⁵¹Cr.

^c Le test de relargage du chrome a été effectué après trois stimulations in vitro. L'activité cytotoxique à l'encontre des cellules autologues EBV incubées avec des peptides ou sans peptides a été mesurée dans un test de relargage de 4 heures. L'activité cytotoxique a été considérée comme positive quand le relargage du chrome est supérieur de 10% à celui observé avec les cellules cibles seules. A1 et A3 correspondent à des cellules EBV incubées avec un ensemble de peptides A1 (n 137-145, n195-202, n 184-191, n121-128 pour V4.16 ou n183-191, n121-128 pour V4.28) et le peptide A3 (n73-82).

^d Le rapport E/T (rapport cellules effectrices/cellules cibles) correspond à 5x10³ cellules cibles marquées, incubées avec des quantités variables de cellules effectrices

TABLEAU 16 (suite 2)
Spécificité des CTL chez les volontaires immunisés

% de lyse spécifique des cellules

Lipoptide incubé avec des cellules cibles	V4.6 ^a		V4.16		V4.18		V4.28	
	W0	W20	W0	W20	W0	W20	W0	W20
Rapport E/T	70/1		25/1				10/1	
Aucun	3%	6%	32%	23%	nd	nd	2%	2%
V3 ENV 303-335	2%	36%	12%	49%	nd	nd	2%	17%
Rapport E/T	70/1		50/1				10/1	
Aucun			13%	23%			2%	2%
anti-A1			2%	48%			5%	34%
anti-A3			nd	nd			nd	nd

^a Les volontaires ont été immunisés avec six lipopeptides sous forme de micelles, ou avec un adjuvant (QS21)

^b Les cellules cibles sont des PBMC autologues sensibilisées avec 10 μ M de chacun des lipopeptides, irradiées et marquées à l'aide de ⁵¹Cr.

^c Le test de relargage du chrome a été effectué après trois stimulations in vitro. L'activité cytotoxique à l'encontre des cellules autologues EBV incubées avec des peptides ou sans peptides a été mesurée dans un test de relargage de 4 heures. L'activité cytotoxique a été considérée comme positive quand le relargage du chrome est supérieur de 10% à celui observé avec les cellules cibles seules. A1 et A3 correspondent à des cellules EBV incubées avec un ensemble de peptides A1 (n 137-145, n195-202, n 184-191, n121-128 pour V4.16 ou n183-191, n121-128 pour V4.28) et le peptide A3 (n73-82).

^d Le rapport E/T (rapport cellules effectrices/cellules cibles) correspond à 5x10³ cellules cibles marquées, incubées avec des quantités variables de cellules effectrices

TABLEAU 16 (suite 3)
Spécificité des CTL chez les volontaires immunisés

Lipopeptide incubé avec des cellules cibles	<u>% de lyse spécifique des cellules</u>							
	V4.5 (QS21)		V4.19 (QS21)		V4.21 (QS21)		V4.34 (QS21)	
	W0	W20	W0	W20	W0	W20	W0	W20
Rapport E/T ^a	60/1		60/1		86/1		35/1	
Aucun	22%	14%	0%	2%	7%	13%	5%	3%
V3 ENV 303-335	24%	16%	2%	6%	2%	23%	3%	3%
Rapport E/T ^a							35/1	
Aucun							2%	2%
anti-A1							nd	nd
anti-A3							2%	2%

^a Les volontaires ont été immunisés avec six lipopeptides sous forme de micelles, ou avec un adjuvant (QS21)













^b Les cellules cibles sont des PBMC autologues sensibilisées avec 10 µM de chacun des lipopeptides, irradiées et marquées à l'aide de ⁵¹Cr.

^c Le test de relargage du chrome a été effectué après trois stimulations in vitro. L'activité cytotoxique à l'encontre des cellules autologues EBV incubées avec des peptides ou sans peptides a été mesurée dans un test de relargage de 4 heures. L'activité cytotoxique a été considérée comme positive quand le relargage du chrome est supérieur de 10% à celui observé avec les cellules cibles seules. A1 et A3 correspondent à des cellules EBV incubées avec un ensemble de peptides A1 (n 137-145, n195-202, n 184-191, n121-128 pour V4.16 ou n183-191, n121-128 pour V4.28) et le peptide A3 (n73-82).

^d Le rapport E/T (rapport cellules effectrices/cellules cibles) correspond à 5x10³ cellules cibles marquées, incubées avec des quantités variables de cellules effectrices

TABLEAU 17

Cellules T CD8' secrétant de l'Interféron- γ / Test Ex-vivo
 Nombre de cellules secrétant de l'Interféron- γ / 1×10^6 cellules

		V4.18 A2/11 B44/60		V4.5 (QS21) A2/11 B18/27		V4.21 (QS21) A1 B8	
		W0	W20	W0	W20	W0	W20
HLA-A1	NEF 121-128					1	41
	NEF 137-145						
	NEF 184-191						
	NEF 195-202						
HLA-A2	NEF 136-145	0	0	0	4		
	NEF 190-198	nd	nd	4	16		
	GAG 183-191	nd	nd	2	16		
HLA-A11	NEF 73-82 ^c	0	15	0	0		
	NEF 84-92	0	55	nd	nd		
	EBN 416-424	500	500	66	63		
HLA-B8	NEF 90-97					1	51
	NEF 182-189						
HLA-B27	NEF 134-141					2	14
	GAG 263-272						
HLA-B18	NEF 135-143					0	9

REVENDICATIONS

1. Micelles mixtes ou micro-agrégats pour l'induction d'une réponse immunitaire contenant au moins:

5 - un premier lipopeptide comprenant au moins un épitope CTL et au moins un motif lipidique. et

- un second lipopeptide comprenant au moins un épitope T auxiliaire et au moins un motif lipidique, dont la nature peut être différente du motif du premier lipopeptide.

2. Micelles ou micro-agrégats selon la revendication 1, 10 caractérisés en ce que les lipopeptides comprennent indépendamment un ou plusieurs motifs lipidiques en C₄ à C₁₈.

3. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisés en ce que les lipopeptides comprennent 15 indépendamment une ou deux chaînes lipidiques en C₄ à C₁₈ associées par liaison covalente à un ou deux acides aminés de la partie peptidique.

4. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que les motifs lipidiques des lipopeptides sont constitués de deux chaînes d'acide palmitique liées aux groupements NH₂ d'une lysine.

20 5. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisés en ce que les motifs lipidiques des lipopeptides comprennent indépendamment un résidu d'acide palmitique, d'acide 2-amino hexadécanoïque, d'acide oléique, d'acide linoléique, d'acide linolénique de pimélaute, de trimélaute ou un dérivé du cholestérol.

25 6. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisés en ce que la partie non lipidique des lipopeptides, comprenant les épitopes, comprend entre 10 et 100, et préférentiellement entre 10 et 50 acides aminés.

7. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisés en ce que l'épitope T auxiliaire est un épitope multivalent.

8. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisés en ce que l'épitope T auxiliaire est le peptide 83O-843 de la toxine tétanique présentant la séquence suivante:

QYIKANSKFIGITE

9. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisés en ce que l'épitope T auxiliaire est l'épitope de l'hémagglutinine ou l'épitope PADRE.

10. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisés en ce que les lipopeptides contiennent au moins un épitope CTL d'une protéine spécifique du mélanome, d'une protéine du VIH, du VHB, du papillomavirus, de la protéine p-53, ou d'une protéine spécifique de *Plasmodium falciparum*.

11. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisés en ce qu'ils comprennent les lipopeptides suivants:

20 GAG 17 EKIRLRPGGKKKYKLKHIV K(Pam)-NH₂
 GAG 253 NPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILD K(Pam)-NH₂
 POL 325 AIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDDL K(Pam)-NH₂
 NEF 66 VGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGL K(Pam)-NH₂
 NEF 116 HTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWLYKL K(Pam)-NH₂
 25 TT Ac-QYIKANSKFIGITELKK K(Pam)-NH₂

12. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisés en ce qu'ils comprennent les lipopeptides suivants:

LSAE CT1 LLSNIEEPKENIIDNLLNNIK(Pam)-NH₂

LSA3 NRI Ac-DELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQK(Pam)-NH₂

LSA3 NRII Ac-LEESQVNDIDFNSLVKSVQQEQQHNVK(Pam)-NH₂

LSA3 RE K(Pam)VESVAPSVVEESVAPSVVEESVAENVVEESVAENV-NH₂

5 13. Utilisation de micelles ou de micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 12 pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin pour l'induction d'une réponse immunitaire spécifique.

 14. Utilisation de micelles ou de micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 12 pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin
10 pour l'induction d'une réponse immunitaire à l'encontre du VIH, du VHB, du papillomavirus, de la p53, du mélanome ou de la malaria induite par *Plasmodium falciparum*.

 15. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient une dose pharmacologiquement efficace de micelles ou de
15 micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 12 et des excipients pharmaceutiquement compatibles.

 16. Médicament ou vaccin, caractérisé en ce qu'il contient des micelles ou des micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 12.

 17. Procédé de fabrication de micelles ou de micro-agrégats
20 selon l'une des revendications 1 à 12, comprenant les étapes suivantes:

- dispersion de chacun des lipopeptides les constituant dans une solution d'acide acétique concentrée à environ 80% puis
- mélange des solutions ainsi obtenues

 18. Procédé selon la revendication 17 caractérisé en ce que
25 l'obtention d'une dispersion des lipopeptides mis en solution dans l'acide acétique est vérifiée par la méthode de résonance magnétique nucléaire en deux dimensions.

 19. Méthode d'induction d'une réponse immunitaire à l'encontre d'un antigène déterminé comprenant au moins l'administration à un

individu, chez lequel une telle réponse est souhaitée, de micelles ou de micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 12.

20. Méthode d'immunisation à l'encontre d'un agent pathogène comprenant l'administration à un individu, chez lequel une telle immunisation est recherchée, de micelles ou de micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 12.

21. Méthode selon l'une des revendications 19 et 20, caractérisée en ce que l'agent pathogène est le VIH, le VHB, le papillomavirus, le mélanome ou *Plasmodium falciparum*, et l'antigène.
un antigène d'un de ces agents, ou la p53.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

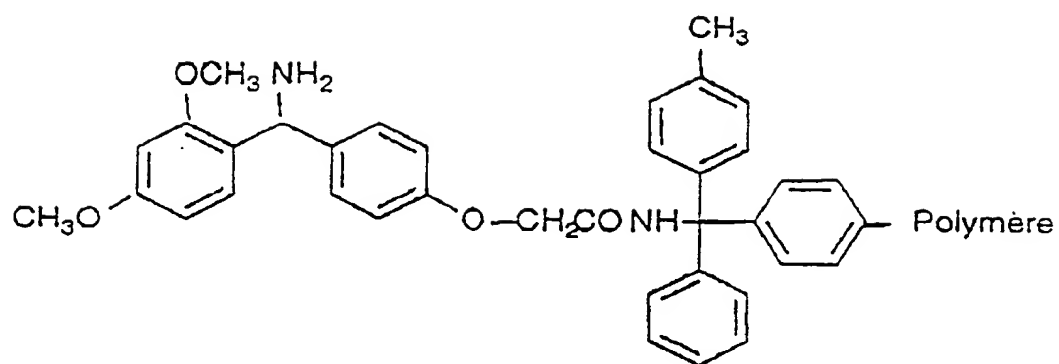
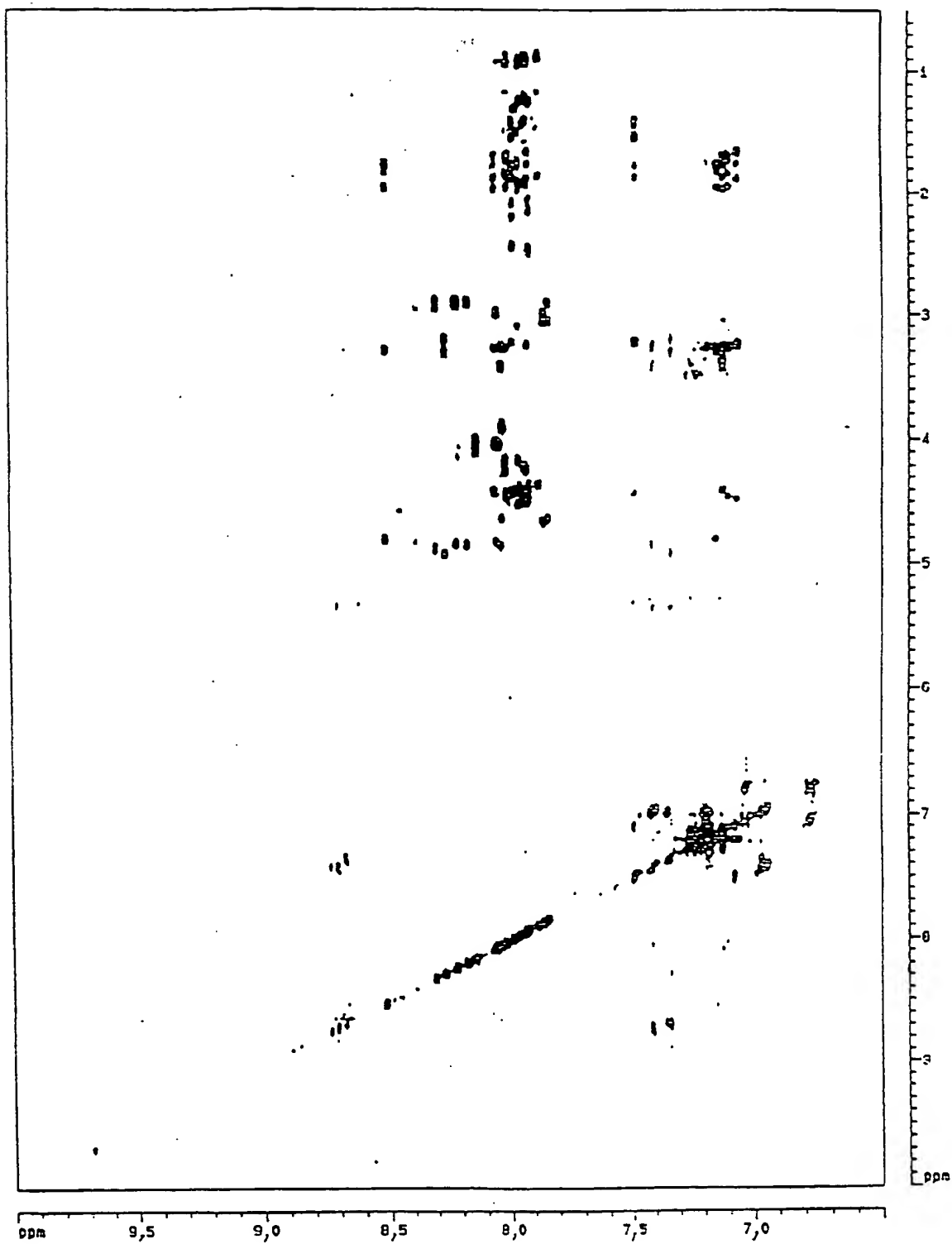


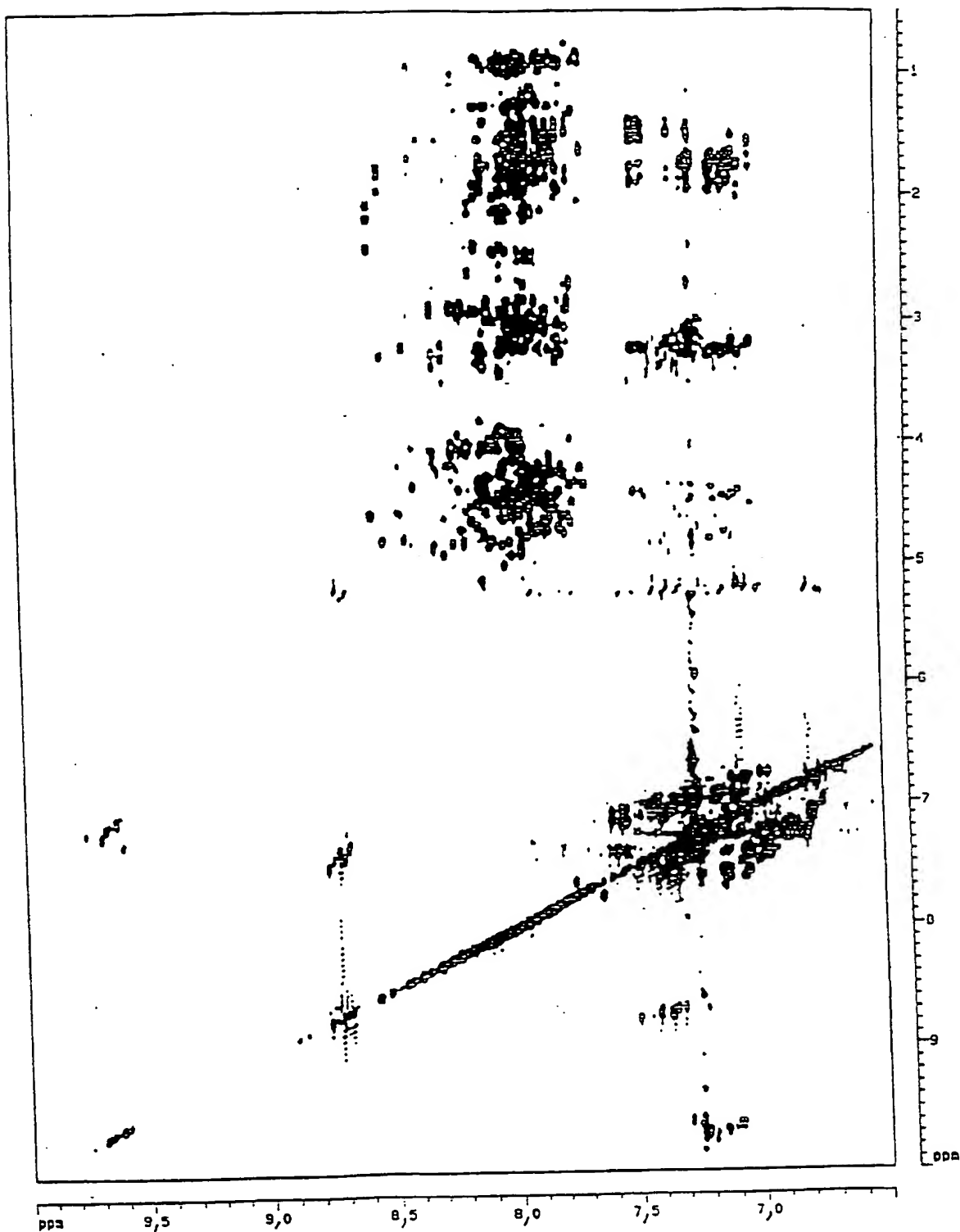
FIGURE 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

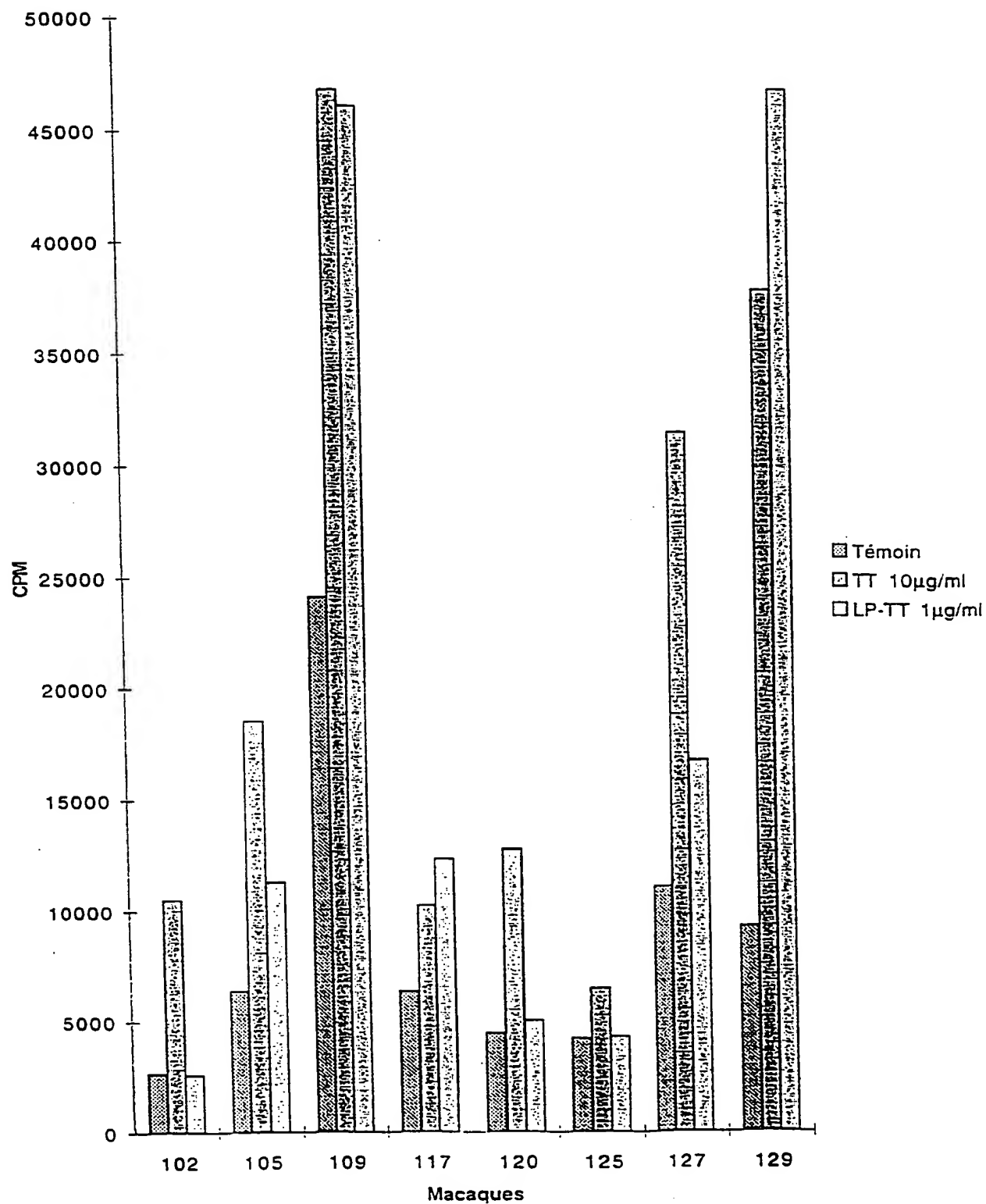
2/11



THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

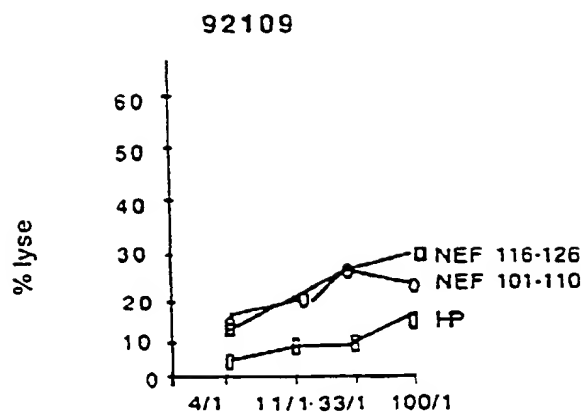


FIGURE 5A

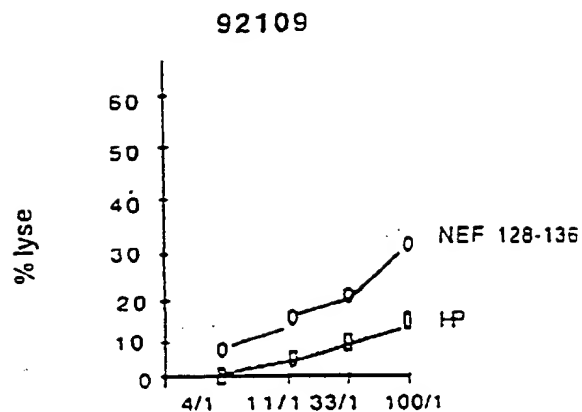


FIGURE 5B

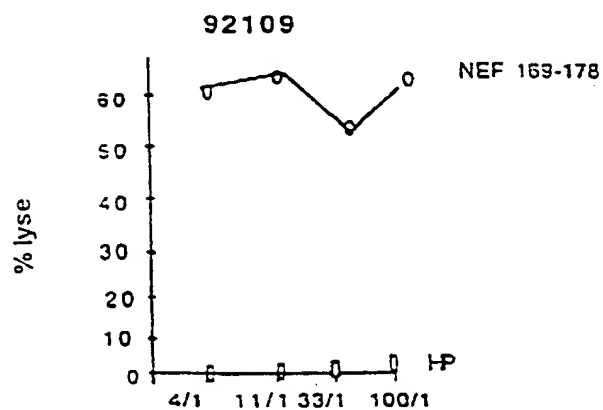


FIGURE 5C

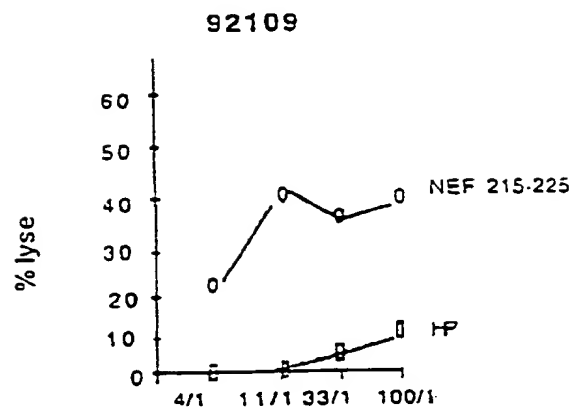


FIGURE 5D

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/11

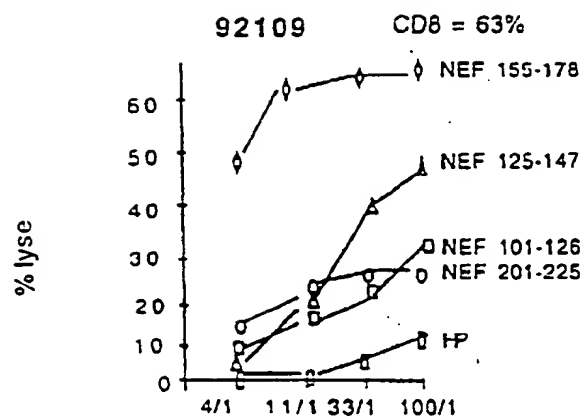


FIGURE 5E

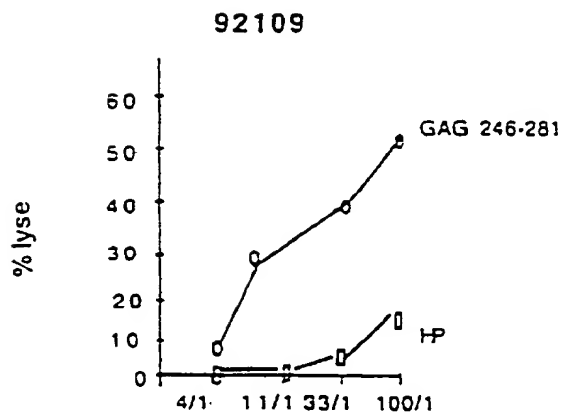


FIGURE 5F

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7/11

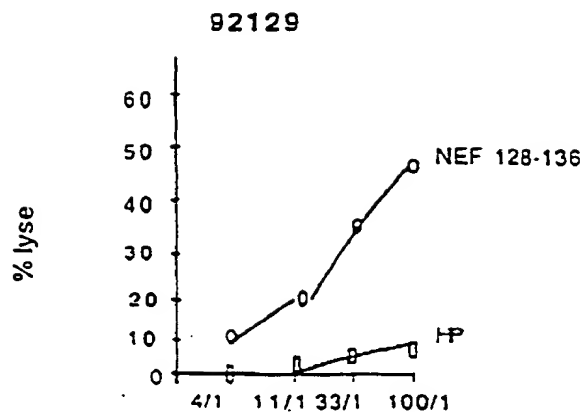


FIGURE 6A

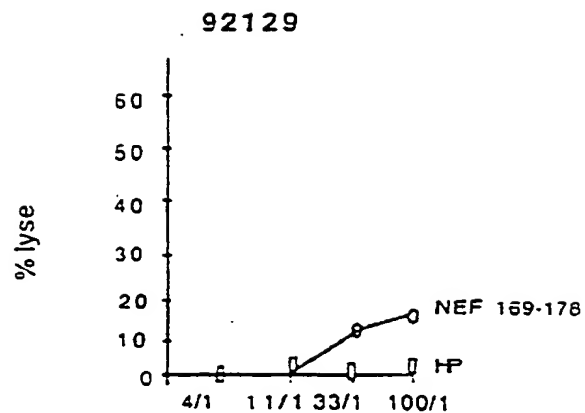


FIGURE 6B

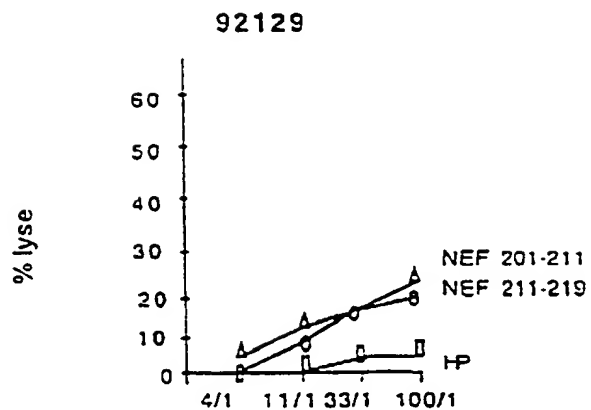


FIGURE 6C

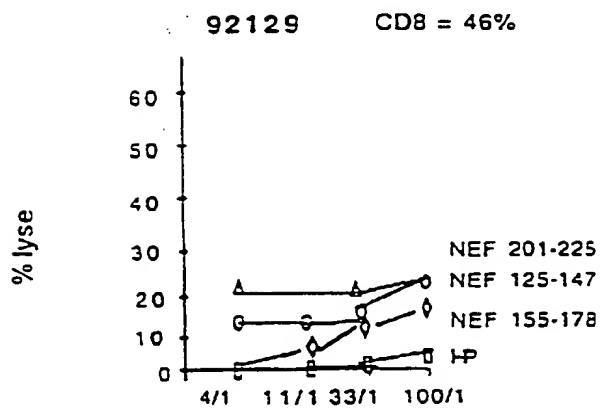


FIGURE 6D

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/11

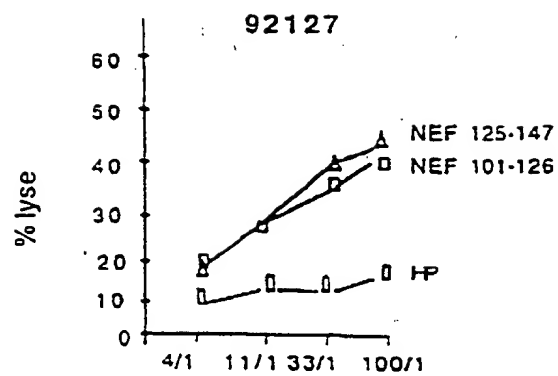


FIGURE 7A

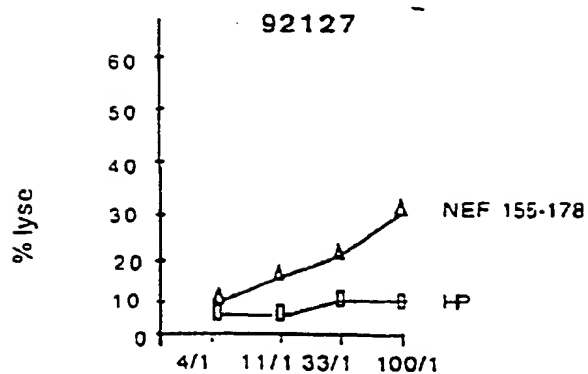


FIGURE 7B

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/11

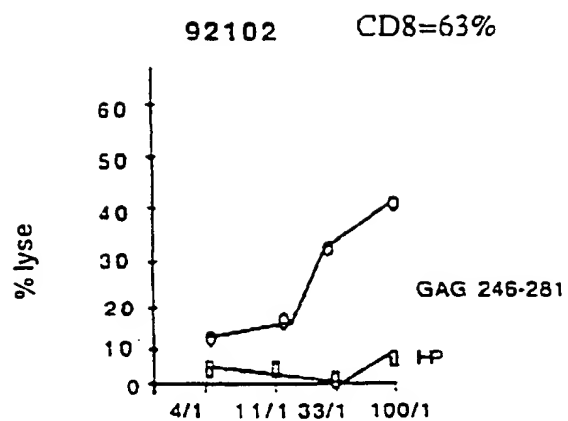


FIGURE 8

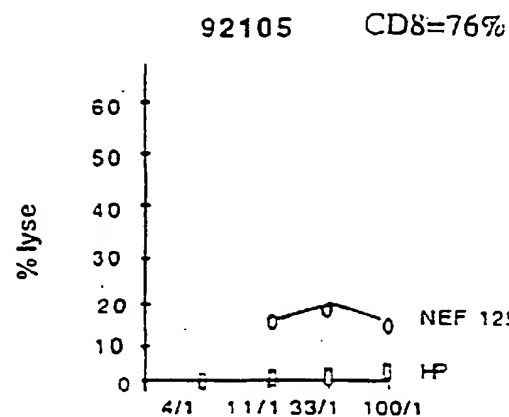


FIGURE 9

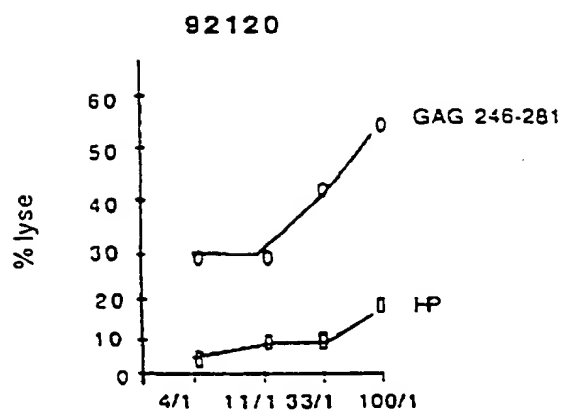


FIGURE 10

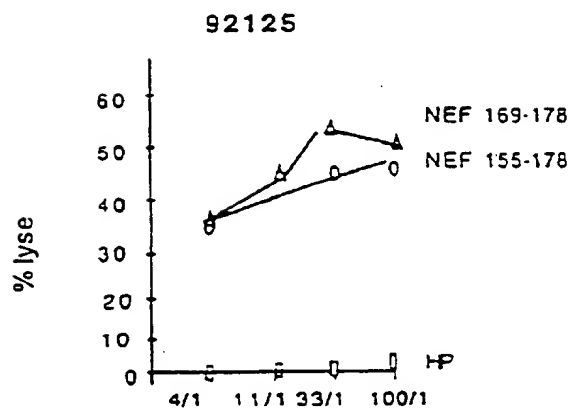


FIGURE 11

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/11

Fig. 12C

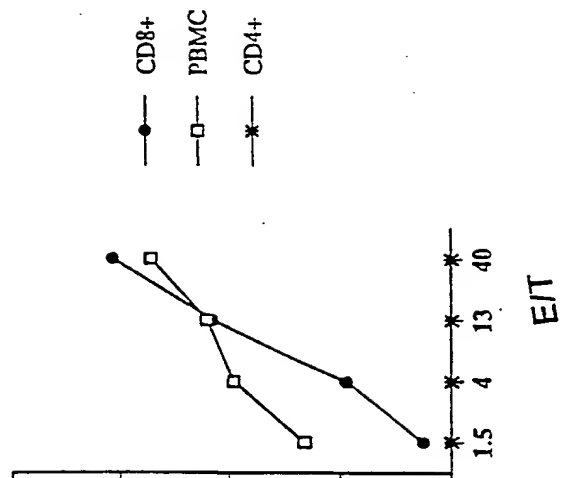


Fig. 12B

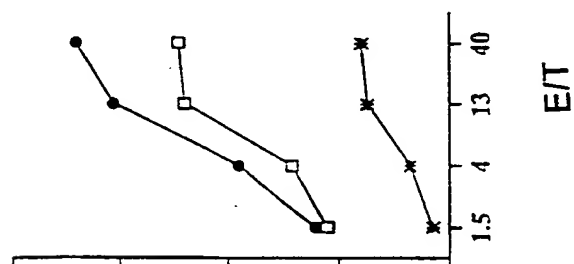
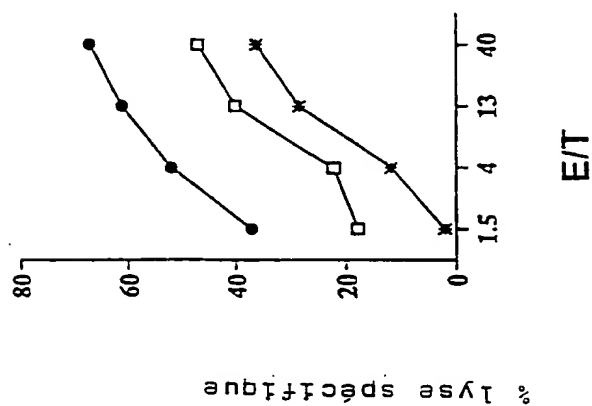


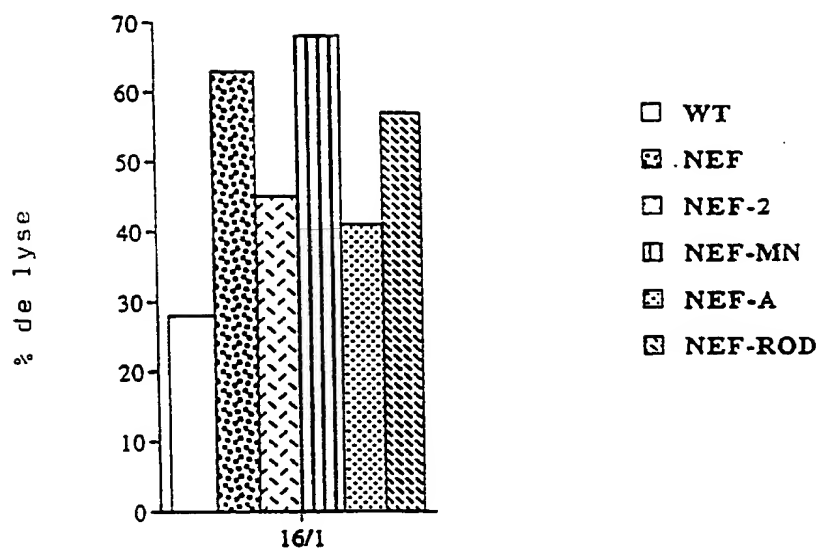
Fig. 12A



THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/11

FIG. 13



Rapport cellules effectrices/cibles

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

14 OCT 1999

Destinataire:

PHELIP, Bruno
CABINET HARLE & PHELIP
7, rue de Madrid
F-75008 Paris
FRANCE

PCT

SOS b.s

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE
INTERNATIONAL
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année)

12.10.99

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
6521 PCT 355

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR98/02605

Date du dépôt international (jour/mois/année)
02/12/1998

Date de priorité (jour/mois/année)
03/12/1997

Déposant

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA... et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

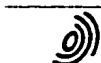
4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Digiusto, M

Tél. +49 89 2399-8162



THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire 6521 PCT 355	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR98/02605	Date du dépôt international (jour/mois/année) 02/12/1998	Date de priorité (jour/mois/année) 03/12/1997
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K39/39		
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA... et al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT):

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 01/07/1999	Date d'achèvement du présent rapport 12. 10. 99
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Cuendet, P N° de téléphone +49 89 2399 8690 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02605

I. Bas du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-69 version initiale

Revendications, N°:

1-21 version initiale

Dessins, feuilles:

1/11-11/11 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02605

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-21
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-21
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-18
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1). Préambule

(i) Au vu des sept documents cités dans le rapport de recherche (D1-D7), il ressort que des compositions - selon la présente revendication 1 - contenant au sein de mêmes micelles/micro-agrégats au moins **2 lipopeptides** présentant au moins un **épitope CTL** et d'autre part au moins un second lipopeptide comprenant un **épitope T auxiliaire** (HTL), n'ont pas été décrites.

(ii) L'art antérieur le plus proche semblerait être le document **D7**: publication de Vitiello et al. (1995). D7 est également cité dans la présente demande, cf. p.ex. à la p.2. Le document D7 décrit **un lipopeptide** comprenant au sein de celui-ci - par une association covalente - les deux épitopes tels qu'indiqués ci-dessus; le lipopeptide de D7 induit également "une réponse immunitaire".

Notons que le document **D2**: publication de Livingston et al. (1997) concerne également une utilisation **du lipopeptide** de D7 (cette publication de Vitiello et al. (D7) correspond à la référence "5" dans D2).

2). Point V.2.**2.1. Nouveauté**

La composition selon la revendication 1 est caractérisée, notamment, par l'élément "un premier et un second lipopeptide"; cet élément semblerait exclure une composition où seul le lipopeptide selon D7 est présent; donc, l'objet de la revendication 1 (et des revendications 2-12) semblerait être nouveau par rapport à l'art antérieur cité, D7 notamment. Une utilisation de cette composition semblerait aussi être nouvelle; cf. revendications 13-21.

2.2. Activité inventive (voir également au point 1(ii) ci-dessus)

Il semblerait que la nature et l'utilisation de la composition selon l'invention présentent des avantages par rapport à l'art antérieur, les documents D7/D2 notamment:

- l'utilisation d'au moins deux lipopeptides au lieu d'un semblerait permettre d'éviter la synthèse de séquences d'acides aminés longues présentant de multiples épitopes (cf. p.3, premier paragraphe);
- la présente composition (micelles mixtes) semblerait présenter l'avantage de pouvoir associer au sein d'un même microvolume une grande diversité de lipopeptides (épitopes) individuels, ce qui semblerait assurer une meilleure

THIS PAGE BLANK (USPTO)

solubilité à l'usage par rapport au lipopeptide unique de D7/D2: un lipopeptide comprenant tous les motifs assemblés par des liaisons covalentes; cf. présente p.6.

2.3. Application industrielle

Il n'existe pas de critère unifié dans les Etats parties au PCT pour déterminer si les revendications 19-21 sont susceptibles d'application industrielle. La brevetabilité peut aussi dépendre de la manière dont les revendications ont été formulées. Ainsi, l'Office européen des brevets ne considère pas comme susceptible d'application industrielle l'objet de revendications d'utilisation d'un composé à des fins médicales. Par contre, peuvent être acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ainsi que des revendications relatives à l'utilisation d'un tel composé dans la fabrication d'un médicament en vue d'un nouveau traitement médical.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 652I PCT 355	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR98/02605	International filing date (day/month/year) 02 December 1998 (02.12.98)	Priority date (day/month/year) 03 December 1997 (03.12.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/39		
Applicant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 01 July 1999 (01.07.99)	Date of completion of this report 12 October 1999 (12.10.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR98/02605

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-69, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-21, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/11-11/11, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 98/02605

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Preamble

(i) Considering the seven documents cited in the search report (D1-D7), it is clear that compositions according to the present claim 1, which contain at least **two lipopeptides** within the same micelles or microaggregates, said lipopeptides having at least one **CTL epitope** as well as at least one second lipopeptide including an **auxiliary T epitope** (HTL), have not been described.

(ii) The closest prior art appears to be document **D7** (publication by Vitiello et al. (1995)). D7 is also cited in the present application (see, e.g., page 2). Document D7 describes a **lipopeptide** containing, by means of a covalent association, both of the epitopes indicated above. The lipopeptide of D7 also induces "an immune response".

It should be noted that document **D2** (publication by Livingston et al. (1997)) also relates to the use of the **lipopeptide** of D7 (said publication by Vitiello et al. (D7) corresponds to reference "5" in D2).

2. Point V.2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2.1 Novelty

The composition according to claim 1 is characterised, in particular, by the feature "a first and a second lipopeptide". This feature appears to rule out a composition in which only the lipopeptide of D7 is present. Therefore, the subject matter of claim 1 (and claims 2-12) appears to be novel over the prior art cited, especially D7. A use of said composition also appears to be novel (cf. claims 13-21).

2.2 Inventive step (see also point 1(ii) above)

It appears that the nature and use of the composition according to the invention have advantages over the prior art, particularly documents D7 and D2, namely:

- the use of at least two lipopeptides instead of one appears to enable the synthesis of long amino acid sequences with multiple epitopes to be avoided (cf. page 3, first paragraph);
- the present composition (mixed micelles) appears to be advantageous in that it can combine a wide variety of individual lipopeptides (epitopes) within a single micro-volume, and thereby appears to provide enhanced solubility in use relative to the single lipopeptide of D7/D2: a lipopeptide including all of the units assembled by covalent bonds (cf. the present page 6).

2.3 Industrial applicability

There are no uniform criteria in the PCT for determining whether claims 19-21 are industrially applicable. Patentability may also be dependent on the way in which the claims are worded. Therefore, the European Patent Office does not consider the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 98/02605

subject matter of use claims relating to the medical use of a compound to be industrially applicable. However, claims relating to a known compound, for a first medical use, will be accepted, as will claims relating to the use of such a compound for producing a drug with a view to a novel medical treatment.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 13 août 1999 (13.08.99)	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 6521 PCT 355
Demande internationale no PCT/FR98/02605	Date de priorité (jour/mois/année) 03 décembre 1997 (03.12.97)
Date du dépôt international (jour/mois/année) 02 décembre 1998 (02.12.98)	
Déposant GRAS-MASSE, Hélène etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

01 juillet 1999 (01.07.99)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Sean Taylor

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)